

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
UMR 1251 Centre de génétique médicale de Marseille

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de Docteur en Pathologie Humaine

Spécialité : Génétique médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Damien Galant

Le 16 Décembre 2019

***Etude des anomalies de la lamine A associées à un
syndrome cardio-métabolique***

Présentée devant le jury :

Dr. Vincent PIALOUX	EA7424	Rapporteur
Pr. Anne-Dominique LAJOIX	DR EA7288	Rapporteur
Pr. Patrice ROLL	INSERM 1251 GMGF	Examineur
Pr. Catherine BADENS	INSERM 1251 GMGF	Directrice de thèse

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
UMR 1251 Centre de génétique médicale de Marseille

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de Docteur en Pathologie Humaine

Spécialité : Génétique médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Damien Galant

Le 16 Décembre 2019

***Etude des anomalies de la lamine A associées à un
syndrome cardio- métabolique***

Présentée devant le jury :

Dr. Vincent PIALOUX	EA7424	Rapporteur
Pr. Anne-Dominique LAJOIX	DR EA7288	Rapporteur
Pr. Patrice ROLL	INSERM 1251 GMGF	Examineur
Pr. Catherine BADENS	INSERM 1251 GMGF	Directrice de thèse

Remerciements

J'aimerais vous dire que l'élaboration de cette thèse fut aisée et sans aspérités ; que je n'ai jamais douté, jamais repoussé les échéances ou que je ne me suis jamais posé la question de vouloir tout arrêter. J'avais observé la difficulté des doctorants sur le point de soutenir lors de ma première année de thèse. Je mettais ça sur le stress et ça ne m'effrayait pas. J'en sous-estimais alors la difficulté.

Au terme de 4 ans, je peux dire avec certitude que ce fut une aventure dont je n'avais pas imaginé la teneur. Aucunement linéaire, cette thèse s'est dessinée par de nombreuses circonvolutions, méandres et impasses. Ce fut un réel challenge teinté de doutes et de remises en question permanente ; un diplôme pas comme les autres ...

La soutenance marque ainsi quelque chose qui s'achève et quelque chose qui commence. Je tenais à remercier, par ces quelques lignes, l'ensemble des personnes qui ont jugé ce travail, m'ont encadré, soutenu et ont été présent au cours de ces 4 années.

Je tiens à remercier en premier lieu, ma directrice de thèse Mme le Professeur Catherine Badens qui m'a encadré lors de ces 5 dernières années. Sa disponibilité, son soutien, ses encouragements et ses conseils se reflètent dans la qualité de ce travail. Sa persévérance à mon égard dans les moments de doute ainsi que les corrections apportées au manuscrit ont permis l'aboutissement de ce travail de thèse. Pour tout cela, merci.

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier et juger avec attention ce travail. J'exprime ma gratitude à Mme le Professeur Anne-Dominique Lajoix et M. le Professeur Vincent Pialoux pour avoir acceptés d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie chaleureusement M. le Professeur Patrice Roll qui a eu l'amabilité d'accepter d'être membre du jury.

J'adresse également mes remerciements aux membres actuels et passés de l'équipe qui m'ont accompagné au cours de ces années de thèse pour leur soutien et leur aide. Je les remercie de leur gentillesse, de leurs encouragements réguliers et de leurs conseils.

A l'ensemble des membres du 4^{ème} et 5^{ème} étage de l'aile verte de la faculté de médecine de Marseille. Votre expertise scientifique et votre bonne humeur m'ont toujours permis d'améliorer ma culture scientifique dans un cadre didactique et bienveillant.

Je remercie Mr le Professeur Nicolas Lévy de m'avoir accepté dans son équipe au sein de Marseille Medical Genetics.

Je souhaite remercier mes parents et mon frère pour tout ce qu'ils m'ont apporté depuis si longtemps. Je ne saurais décrire précisément à quel point leur soutien m'est précieux. Je les remercie de leur force indéfectible et de m'avoir sans cesse permis de nourrir ma curiosité.

Je remercie enfin celles et ceux qui ont partagé ces dernières années qu'il soit marseillais ou d'ailleurs. Je suis désolé de vous avoir délaissé au cours de ces derniers mois. Merci pour vos drôleries, votre gentillesse, vos attentions et vos inquiétudes. Finalement, merci d'être là quand le travail s'arrête.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	4
Partie 1 : Introduction.....	7
I. L'enveloppe nucléaire	8
II. Les lamines.....	10
A. Les différents types de lamines	10
B. Structure des lamines	12
C. Modifications post-traductionnelles de la prélamine	14
D. Rôles des lamines	18
E. Partenaires protéiques des lamines.....	24
III. Le tissu adipeux.....	35
A. Généralités.....	35
B. Origine du tissu adipeux.....	36
C. Les différents types de tissu adipeux.....	37
D. Fonctions du tissu adipeux	39
IV. Les laminopathies.....	42
A. Les laminopathies tissu-spécifiques	43
B. Les laminopathies multi-systémiques	46
C. Les lipodystrophies	52
D. Le syndrome de Dunnigan	61
V. Le syndrome métabolique : une forme atténuée de laminopathie spécifique du tissu adipeux ?	65
Partie 2 : Travail expérimental	73
Matériels et Méthodes	75
I. Techniques de biologie moléculaire et cellulaire	76
A. Lignées cellulaires contrôle et patients	76
B. Culture cellulaire de lignées primaires de fibroblastes humains.....	76
C. Extraction des protéines totales.....	77
D. Quantification des protéines.....	78
E. Western Blot.....	78
F. Fixation des cellules	79
G. Immunofluorescence	79

H.	Microscopie	79
II.	Transfection.....	81
A.	Mutagenèse dirigée	81
B.	Transfection de plasmides	82
C.	Transfection de siRNA.....	83
III.	Tests de sénescence	84
A.	Temps de doublement de population	84
B.	Sénescence associée à la β -galactosidase.....	84
C.	Incorporation de BrdU	85
IV.	Séquençage haut débit.....	86
V.	Analyse statistique.....	87
	Résultats	88
I.	Description clinique des patients.....	89
A.	Patient avec une mutation du gène <i>ZMPSTE24</i> :	89
B.	Patients présentant une mutation du gène <i>LMNA</i> :	90
C.	Patients avec aucune mutation identifiée	95
II.	Etude du patient ayant la mutation du gène <i>ZMPSTE24</i>	96
A.	Analyse de la mutation <i>in silico</i>	96
B.	Caractérisation des anomalies nucléaires	97
C.	Tests de prolifération cellulaire et test de sénescence	97
D.	Modulation de l'expression de la lamine A par transfection d'ARN interférent ...	101
III.	Etude des patients ayant une mutation du gène <i>LMNA</i>	103
A.	Analyse des mutations <i>in silico</i>	103
B.	Caractérisation des anomalies nucléaires	104
C.	Transfection transitoire de plasmides.....	105
D.	Modulation de l'expression de la lamine A par transfection d'ARN interférent ...	107
E.	Etude de la prolifération cellulaire et test de sénescence	109
IV.	Etude des patients sans mutation identifiée.....	113
A.	Tests de prolifération cellulaire et sénescence	113
B.	Traitement par ARN interférent anti lamine A	117
C.	Séquençage haut-débit.....	120
	Discussion	122
A.	Mutation <i>ZMPSTE24</i>	123
B.	Mutations <i>LMNA</i>	127
C.	Patients sans mutations identifiées	131

Conclusion.....	135
Articles et Revues.....	138
I. Article: A heterozygous <i>ZMPSTE24</i> mutation associated with severe metabolic syndrome, ectopic fat accumulation, and dilated cardiomyopathy	139
II. Article: Identifying patients with <i>LMNA</i> mutations: linking metabolic phenotype to cellular senescence	151
III. Revue : <i>LMNA</i> mutations associated with atypical lipodystrophic syndrome (Manuscrit en préparation)	167
Liste des tableaux et des figures.....	202
Tableaux	203
Figures	204
Références bibliographiques	206

Liste des abréviations

53BP1 : p53 Binding Protein 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGPAT2: 1-acylglycérol-3-phosphate-O-Acyltransférase 2

AKT : Sérine/Thréonine Kinase

ARN : Acide Ribonucléique

ATGL: Adipose Triglycéride Lipase

ATP : Adénosine Triphosphate

BAF=BANF1 : Barrier to Autointegration Factor 1

BER : Base Excision Repair

BrDU : Bromodésoxyuridine

C/EBP α : CCAAT Enhancer-Binding Protein alpha

Cdk : Cyclin dependent kinase

CGL : Congenital Generalized Lipodystrophy

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

CIDEC : Cell death inducing DFFA like effector C

CMT : Maladie de Charcot Marie Tooth

DamID : DNA adenine methyltransferase identification

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DNAPK : DNA-dependent protein kinase

EDMD : Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss

EGIR : European Group for the study of Insulin Resistance

FPLD : Familial Partial Lipodystrophy

FTO : Fat mass and obesity-associated protein

GLP-1: Glucagon Like Peptide-1

GWAS : Genome-wide association Studies

HDL : High Density Lipoprotein

HGMD : Human Gene Mutation Database

HGPS : Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome

HR : Homologous Recombination

IDF : International Diabetes Federation

IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion

IMC : Indice de Masse Corporelle

IRS : Insulin Resistance Syndrome

Kash : Klarsicht, ANC-1, Syne Homology

LADs : Lamina-associated Domains

LAP : Lamin Associated Polypeptide

LBR : Lamin B Receptor

LDL : Low Density Lipoprotein

LEM : LAP2, Emerin, MAN1 Domain

LEMD : LEM Domain Containing

LGMD1B : Limb Girdle Muscular dystrophie type 1B

LINC : LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

LIPE : Hormone liposensible

MAN1=LEMD3: LEM Domain Containing 3

MC4R : Melanocortin 4 receptor

MEST: Mesoderm Specific Transcript

MiR : MicroRNAs

MSC : Musculine

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

NCEP / ATP III : National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III

NER : Nucleotide Excision Repair

NHEJ : Non Homologous End Joining

NLS : Nuclear Localization Signal

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAI1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PDL: Population Doubling Level

PI3PK : Phosphoinositide 3-kinase
PKA : Protéine Kinase A
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PTRF : Polymerase I and transcript release factor
RCE1/FACE2 : Ras Converting CAAX Endopeptidase 1
ROS : Reactive Oxygen Species
SM : Syndrome Métabolique
SREBP1: Sterol Regulatory Element Binding Protein 1
SRSF-1: Serine/Arginine Rich Splicing Factor 1
SUMO: Small Ubiquitin Like Modifier
SUN: Sad1 And UNC84 Domain Containing 1
SYNE : Synaptic nuclear envelope protein
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
UCP1 : Uncoupling protein 1
UTR : Untranslated region
UV : Ultraviolet

Partie 1 : Introduction

I. L'enveloppe nucléaire

L'information génétique est compartimentée dans le noyau des cellules eucaryotes. Le noyau est l'organite le plus imposant de la cellule avec un diamètre de 5 à 7 microns. Il a un rôle de stockage de l'ADN et contient la machinerie permettant la réplication et l'expression de l'information génétique. Le noyau est délimité par l'enveloppe nucléaire composée de deux membranes phospholipidiques séparées par un espace périnucléaire d'une épaisseur de 20nm (Choi et Worman 2014) (**Figure 1**).

L'enveloppe nucléaire est traversée par les pores nucléaires qui sont des complexes multiprotéiques permettant l'échange d'information entre le noyau et le cytoplasme et notamment le trafic des ARNs et des protéines (Chatzifrangkeskou, Bonne, et Muchir 2015). La membrane externe est connectée avec le réticulum endoplasmique. La membrane interne fait face au nucléoplasme et elle est tapissée d'un réseau tridimensionnel de filaments intermédiaires appelé lamina nucléaire composée majoritairement de protéines de type lamine (Claire L. Navarro, Cau, et Lévy 2006). L'enveloppe nucléaire se désagrège pendant la mitose et se reconstitue après séparation du matériel génétique des deux cellules filles (Alberts et al. 2002).

L'enveloppe nucléaire

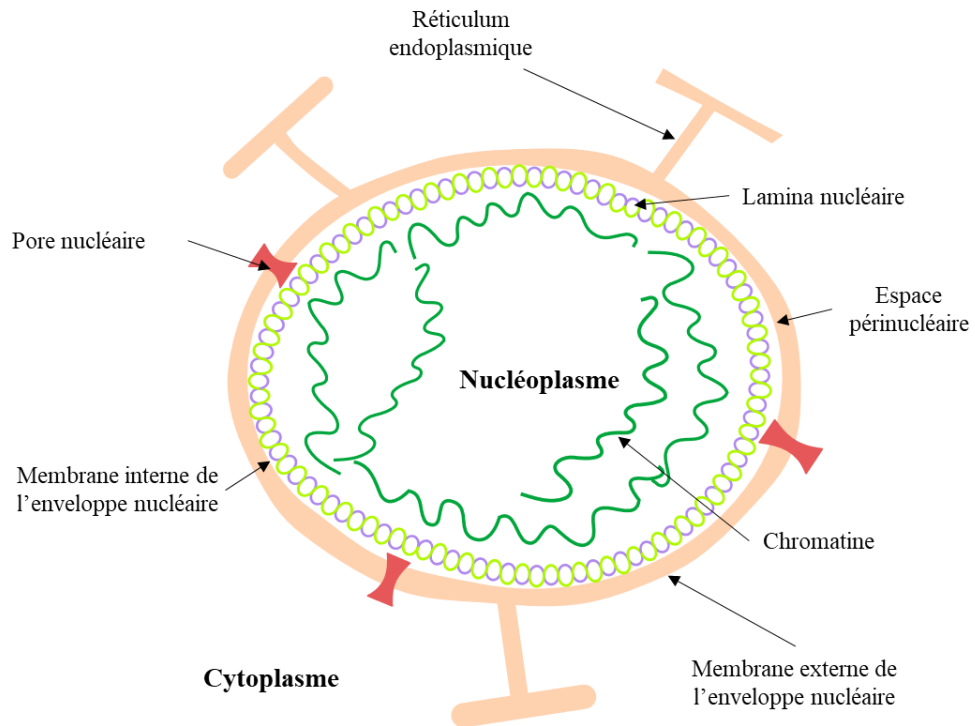


Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire

II. Les lamines

A. Les différents types de lamines

Les lamines sont des protéines ubiquitaires, exclusivement nucléaires appartenant à la superfamille des filaments intermédiaires. Ce sont des filaments intermédiaires de type V qui s'assemblent pour former un réseau tridimensionnel sous-jacent à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire appelé lamina nucléaire.

Il existe deux types de lamines classées selon leurs propriétés biochimiques, leurs structures et leurs profils d'expression : les lamines de type A et les lamines de type B.

Les lamines de types B sont codées par le gène *LMNB1* (5q23.2) produisant la lamine B1 (586 acides aminés) et par le gène *LMNB2* (19p13.3) produisant grâce à un épissage alternatif, la lamine B2 (600 acides aminés) et la lamine B3 (483 acides aminés). Les lamines B1 et B2 sont ubiquitaires dans les cellules somatiques. Elles sont fixées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire grâce à leur groupement farnésyle et jouent un rôle important dans la structure de la lamina nucléaire (Broers et al. 2006). La lamine B3 est une isoforme plus petite qui s'exprime uniquement dans les cellules germinales (Elkhatib et al. 2015).

Les lamines de type A sont codées par le gène *LMNA* (1q22), qui code pour plusieurs isoformes obtenues par épissage alternatif. La lamine A (664 acides aminés) et la lamine C (572 acides aminés) sont majoritaires. Elles ne sont pas fixées à l'enveloppe nucléaire et restent donc solubles dans le nucléoplasme. Alors que la lamine C est produite directement sous forme active, la lamine A et les lamines B sont produites d'abord sous la forme d'un précurseur appelé prélamine, transformé ensuite en lamine après plusieurs étapes de maturation qui sont détaillées

plus loin. Les lamines A Δ 10 (634 acides aminés) et A Δ 50 (614 acides aminés) sont minoritaires. La lamine A Δ 10 est exprimée à moins de 1% et se caractérise par l'absence de l'exon 10 éliminé par épissage alternatif. La lamine A Δ 50 ou progérine se caractérise par l'absence de la partie codée par la fin de l'exon 11, ce qui empêche la maturation de la prélamine en lamine. Elle est produite grâce à l'utilisation d'un site cryptique d'épissage, activé par la mutation typique de la Progéria. La progérine serait également produite physiologiquement par l'organisme chez les personnes âgées (Scaffidi et Misteli 2006; McClintock et al. 2007). La progérine reste fixée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire contrairement à la lamine A qui est soluble dans le nucléoplasme. Enfin, les lamines C2 (462 acides aminés), obtenues par épissage alternatif, sont exprimées uniquement dans les cellules germinales et notamment dans les spermatides (Dechat et al. 2010) (**Figure 2**).

B. Structure des lamines

Les lamines se composent comme tous les filaments intermédiaires de 3 domaines caractéristiques. Le domaine de la tête globulaire est situé en N-terminal. Le domaine de la tige en hélice α est composé de 4 sous-domaines 1A, 1B, 2A et 2B séparés par des segments de liaison (L1, L12, L2) (Strelkov et al. 2004). Le domaine de la queue situé en C-terminal se compose du signal NLS d'adressage au noyau, d'un site de fixation aux immunoglobulines et du motif CAAX (C= cystéine, A= acide aminé aliphatique, X= acide aminé non défini) spécifique aux filaments intermédiaires permettant la farnésylation et la fixation des lamines à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (Krimm et al. 2002; Dhe-Paganon et al. 2002)

(Figure 2).

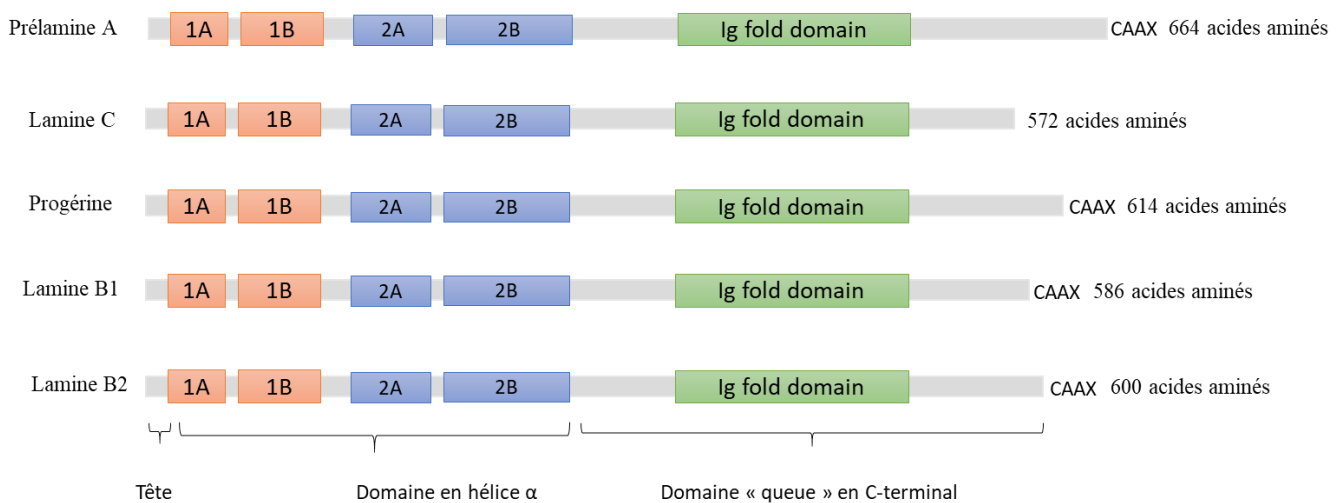


Figure 2 : Description des différents types de lamines

Les lamines de type A comprennent les lamines A et C. La lamine C ne présente pas d'extrémité CAAX commune aux autres types de lamines. Les lamines de type B comprennent majoritairement les lamines B1 et B2. La progérine ou lamine $\Delta 50$ impliquée dans la progéria est une protéine anormale délétée de 50 acides aminés dans la région C-terminale. La délétion comprend le site de clivage par ZMPSTE24 qui est une des étapes de maturation de la prélamine.

Les lamines s'associent hiérarchiquement entre elles pour former un réseau tri-dimensionnel complexe constituant la lamina nucléaire. Elles forment dans un premier temps des dimères (Akey 1989). Ces dimères s'assemblent longitudinalement entre les domaines de la tête et de la queue pour former des polymères contenant 2 à 4 dimères (Aebi et al. 1986). Les protofilaments sont issus de l'association de polymères formant une structure apolaire. *In vitro*, l'association des protofilaments amènent à la formation tridimensionnelle de filaments intermédiaires de 10nm de diamètre (Dittmer et Misteli 2011). La formation des filaments de lamines de 10nm n'a été montré que *in vitro* rendant sûrement inadapté cette structure dans un contexte biologique. Les filaments de lamines ont été mis en évidence de façon stable uniquement chez *Caenorhabditis elegans*. (Ben-Harush et al. 2009). (**Figure 3**).

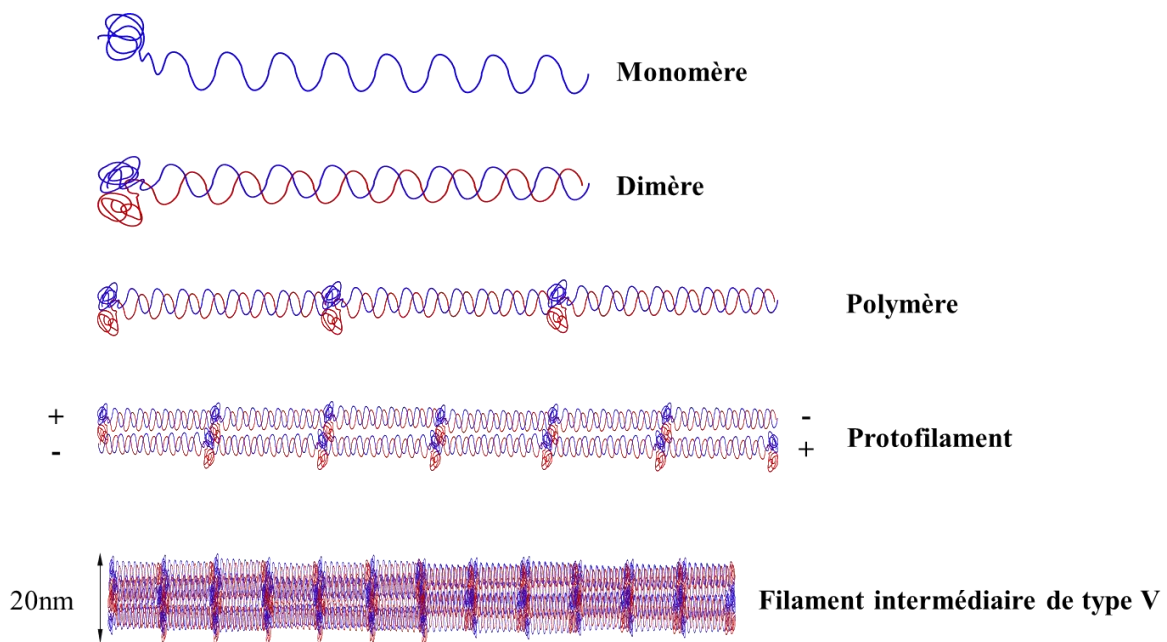


Figure 3 : Représentation schématique de l'association des lamines.

Les lamines s'associent en dimère et forment un polymère par une liaison « head to tail ». Les polymères s'agrègent de façon antiparallèle et forment une structure nommée protofilament. L'association tridimensionnelle des protofilaments forme un filament intermédiaire de type V.

*Adapté de Foisner, Mistelli et al. 2011

C. Modifications post-traductionnelles de la prélamine

Si la lamine C est produite directement sous sa forme fonctionnelle, les lamines B1, B2, et A sont traduites dans le cytoplasme sous forme de prélamines et subissent une série de modifications post-traductionnelles au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Le motif CAAX à l'extrémité C-terminale est un site de prénylation (Pendás et al. 2002).

1. Maturation des prélamines

La prénylation est une modification post traductionnelle des protéines permettant l'association d'un groupement farnésyle ou géranyl-géranyle à l'extrémité C-terminale de la protéine. Elle s'effectue sur un résidu cystéine du motif CAAX où C désigne le résidu Cystéine, A un acide aminé aliphatique et X n'importe quel autre acide aminé. La prénylation est ubiquitaire dans les cellules eucaryotes et a été mise en évidence pour plus de 300 protéines. Elle est notamment impliquée dans les protéines de type lamine, les protéines Ras et les protéines G (M. Wang et Casey 2016).

Les 3 premières étapes de maturation sont communes pour les différents types de lamines. Dans un premier temps, une farnésyl-transférase vient fixer un groupe farnésyle sur la cystéine du motif CAAX, ce qui permet l'ancrage des protéines à la membrane du réticulum endoplasmique. Puis les trois derniers acides aminés sont clivés par une métalloprotéase FACE2/RCE1 ou FACE1/ZMPSTE24 et le motif AAX est éliminé. La troisième étape permet la carboxyméthylation du groupement –COOH de la cystéine à l'extrémité C-terminale. Cette troisième étape permet la fixation permanente à la membrane du réticulum endoplasmique des lamines de type B. Elles sont ensuite adressées par leur signal NLS (Nuclear Localization Sequence) au noyau en transitant le long de la membrane du réticulum endoplasmique,

intègrent le noyau par les pores nucléaires et restent enchâssées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (Claire L. Navarro, Cau, et Lévy 2006) (**Figure 4**).

Les lamines de type A subissent une dernière étape de maturation qui permet à la protéine d'être soluble. La métalloprotéase FACE1/ZMPSTE24 reconnaît spécifiquement une séquence d'acides aminés située en amont de l'extrémité C-terminale, clive les 15 derniers acides aminés et permet ainsi la libération d'une protéine soluble et mature : la lamine A (Cau et al. 2014) (**Figure 4**).

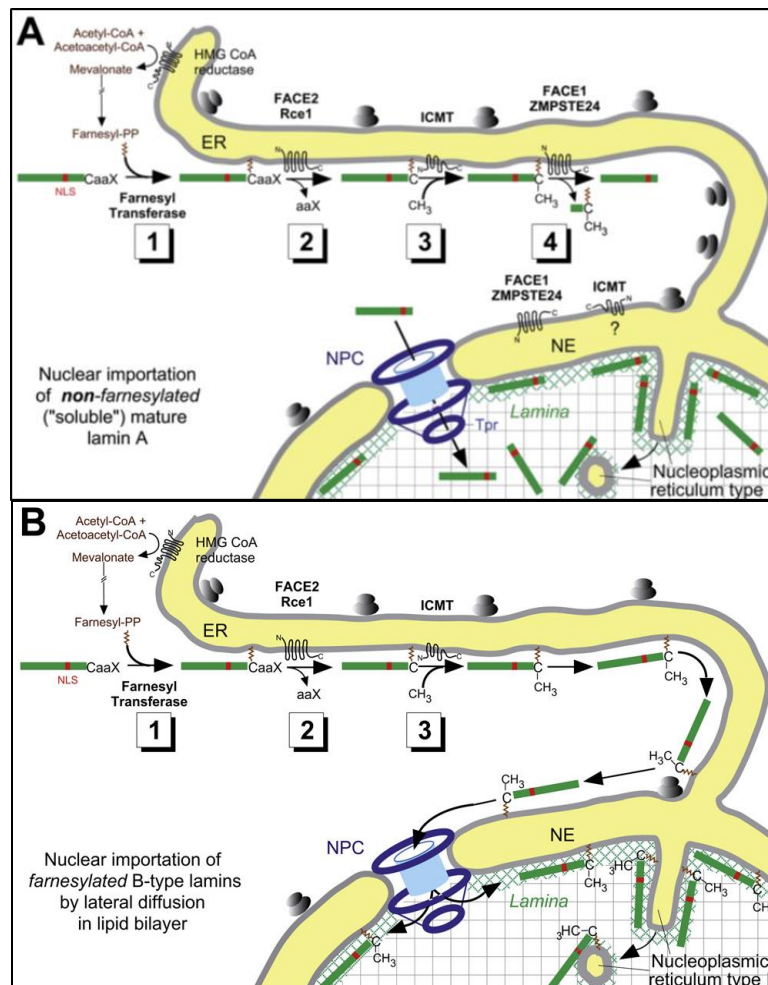


Figure 4 : Modifications post-traductionnelles des lamines

La prélamine A est farnésylée à la membrane du réticulum endoplasmique et subit des étapes de modifications post-traductionnelles avant d'être libérée dans le cytoplasme et adressée via son signal NLS au noyau (A). Les lamines B restent farnésylées à la membrane du réticulum endoplasmique et rejoignent le noyau et composent la lamina nucléaire. (B)

*Cau et al. 2014

2. Phosphorylation

La phosphorylation des protéines est une des modifications post-traductionnelles les plus fréquentes des cellules eucaryotes. La phosphorylation permet l'ajout par des kinases d'un groupement phosphate sur les groupements hydroxyles (-OH) des chaînes latérales des acides aminés de type sérine et thréonine. Cette modification est réversible par action des phosphatases permettant de déphosphoryler les résidus. La phosphorylation régule l'activité de nombreuses protéines et joue un rôle dans leur activation ou leur inactivation. Elle est induite par des protéines kinases spécifiques régulées par différents facteurs (Hunter 1995).

La phosphorylation joue un rôle prépondérant dans l'organisation et la stabilité des différents types de lamines (M. Haas et Jost 1993). Elle permet avec d'autres modifications post-traductionnelles de réguler l'équilibre entre polymérisation-dépolymérisation des filaments intermédiaires (Kochin et al. 2014). Cet équilibre est dû à la phosphorylation des résidus sérine situés dans le domaine de la tête (Chen et al. 2013). Lorsqu'elles sont phosphorylées, les lamines ne peuvent pas polymériser. La phosphorylation des lamines permet donc de modifier leurs propriétés physico-chimiques (Cenni et al. 2005; Guo et al. 2014).

La phosphorylation joue également un rôle dans les propriétés mécaniques du noyau en agissant sur la localisation, la stabilité des lamines de type A et leurs interactions avec d'autres protéines nucléaires (Kochin et al. 2014; Buxboim et al. 2014). Différents tissus présentent des marques de phosphorylation spécifiques qui reflètent la régulation des différents types de lamines.

Dans les domaines de la tête et de la queue, des sites de phosphorylation dits « mitotiques » ont été mis en évidence dans les différents types de lamines. Les résidus sérine dans ces domaines interagissent avec les protéines de la famille Cdk. La phosphorylation des lamines est cruciale pendant la mitose (Heald et McKeon 1990). En effet, plusieurs études ont montré un état d'hyperphosphorylation des lamines. Cet état, associé au rôle prépondérant des microtubules lors de la mitose, favorise le désassemblage complet de la lamina nucléaire et de l'enveloppe

nucléaire permettant la séparation du matériel génétique des deux cellules filles (Panorchan et al. 2004).

La dérégulation de la phosphorylation des lamines a été mise en évidence dans les myoblastes de patients atteints de laminopathies tissu-spécifiques musculaires. Cette étude fait état d'un état d'hypophosphorylation menant à une dérégulation de la structure de l'enveloppe nucléaire. Les cellules in vitro et in vivo montrent une désorganisation du réseau des lamines et une perte de l'intégrité du noyau (V. Cenni et al. 2005; Vittoria Cenni et al. 2008).

3. Sumoylation

La sumoylation est une modification post-traductionnelle réversible sur les résidus lysine. Elle a pour rôle de réguler l'activité de différentes protéines (trafic, interaction, transcription). Les protéines SUMO (small ubiquitin-like modifiers) se fixent sur les motifs vKX(D/E) via la protéine E2 ubiquitine ligase (Geiss-Friedlander et Melchior 2007; Flotho et Melchior 2013). La sumoylation contribue à contrôler la localisation et la formation des filaments intermédiaires de lamine A via la protéine SUMO-1 (Boudreau et al. 2012).

4. Autres modifications post-traductionnelles

Les lamines subissent de nombreuses autres modifications post-traductionnelles dont le rôle est encore mal déterminé. De nombreuses publications rapportent des modifications post-traductionnelles comme la O-glycosylation et l'ubiquitinylation (Cau et al. 2014; Ferraro et al. 1989).

D. Rôles des lamines

1. Rôle dans l'organisation chromatinienne

La chromatine s'organise dans le noyau interphasique sous forme de territoires chromatiniens ou zones chromatiniennes (Li et Zhu 2015). Les régions chromatiniennes pauvres en gène sont situées en périphérie, contrairement aux régions riches en gènes localisées au centre du noyau. Cette organisation varie selon le type cellulaire étudié. Depuis les années 1990, des études sur la drosophile ont permis de mettre en évidence les interactions entre la lamina nucléaire et la chromatine. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces interactions sont restés non élucidés jusque récemment. Le lien entre les lamines et les territoires chromatiniens en périphérie a été mis en évidence par la technologie DamID. Elle consiste à faire agir une adénine DNA méthyltransférase bactérienne sur les protéines de la lamina nucléaire ce qui entraîne la méthylation de l'adénine, permettant de détecter les zones de liaisons entre la chromatine et les lamines (Pickersgill et al. 2006). Ces zones appelées LADs (lamina-associated domains) sont observées par microscopie ou cartographiées par ChIP et restent difficile à interpréter (Handoko et al. 2011). A ce jour, entre 1000 et 1500 LADs ont été identifiés qui couvrent plus de 30% du génome humain. Les LADs sont composés de régions pauvres en gènes (Guelen et al. 2008). Les gènes situés dans des LADs sont majoritairement réprimés ou exprimés faiblement et associés à des marques d'histones répressives. Des expériences de DamID sur génome entier et ciblant différents types de lamines ont montré des résultats similaires en dépit du fait que les lamines A et C sont réparties dans l'ensemble du noyau (van Steensel et Belmont 2017). D'autres études ont montré des liens directs entre les lamines et la chromatine au centre du noyau indépendamment de la structure des LADs soulignant la difficulté d'interpréter les interactions entre la chromatine et les différents pools de lamine. Ainsi, il est admis que les lamines permettent via les LADs et les autres interactions une régulation de l'expression génique (van Bemmelen et al. 2010).

Une étude a montré l'importance de la lamine A et de la protéine LBR dans la fixation de l'hétérochromatine à la lamina nucléaire. L'expression des deux protéines est variable en fonction du stade de différenciation des cellules. La protéine LBR est exprimée dans les cellules peu différenciées alors que la lamine A se retrouve majoritairement dans les cellules différenciées. Le K.O de la lamine A ou de LBR chez la souris entraîne une inversion des différents types de chromatine (Solovei et al. 2013; Gonzalez-Suarez et al. 2009). L'hétérochromatine se localise dans le centre du noyau et l'euchromatine en périphérie. L'association de la lamina et de la chromatine est ainsi médiée par de multiples interactions entre les lamines et d'autres protéines du noyau. Le rôle de cette liaison est encore peu connu mais tend à révéler des rôles complexes de la lamine A sur l'expression génique et sur l'organisation chromatinienne (Shimi et al. 2008).

2. Rôle des lamines dans la réplication et la réparation de l'ADN

L'instabilité génomique est la tendance du génome à acquérir des modifications épigénétiques, des altérations géniques ou chromosomiques. Cette instabilité est corrigée par la machinerie cellulaire et permet de maintenir, de répliquer et de transmettre l'information génétique de manière fidèle. On estime que plus de 300,000 lésions par cellule et par jour surviennent sur l'ADN et sont dues à des facteurs endogènes (radicaux libres, ROS) et des facteurs exogènes (UV, rayon X, composés chimiques). La cellule a mis en place au cours de l'évolution des mécanismes complexes permettant de réparer les lésions de l'ADN. Deux mécanismes jouent un rôle prépondérant dans la réparation des cassures double brin d'ADN et le maintien de la stabilité du génome. Les systèmes de recombinaison homologue (HR) et non homologous end joining (NHEJ) sont complémentaires et utilisent des substrats différents (Kakarougkas et Jeggo 2014). La recombinaison homologue répare les dommages avec une grande fidélité par l'utilisation d'un brin homologue. Ce processus se manifeste durant les phases S et G2 du cycle

cellulaire. Le système NHEJ est plus rapide, agissant tout au long du cycle cellulaire, mais peut induire des erreurs lors de la réparation de la cassure double brin d'ADN (Shibata et al. 2011).

Des études ont montré chez des souris *Lmna*^{-/-} une instabilité génomique définie par une augmentation des cassures chromosomiques et une tendance à l'aneuploïdie (Gonzalez-Suarez et al. 2009). Par la suite, d'autres études ont mis en évidence l'importance de la lamine A dans les systèmes de réparation NHEJ et HR. Sur des cellules de souris *Lmna*^{-/-}, le système NHEJ est fortement dérégulé par la perte du facteur 53BP1 (Redwood et al. 2011). La stabilité de 53BP1 est médiée par la cathepsine L fortement dérégulée dans les cellules déficientes en lamine A et C. Cette dérégulation entraîne un défaut du système NHEJ potentialisé par le facteur 53BP1 (Gonzalez-Suarez et al. 2011). Les cellules déficientes en lamine A montrent également une perte du système de réparation HR. Des expériences montrent que la déplétion en lamine A entraîne une diminution de la transcription des facteurs BRCA1 et RAD51 qui codent pour des protéines nécessaires au système HR (Gonzalo 2014). Cette dérégulation n'est pas encore élucidée mais montre le rôle indirect de la lamine A sur le système HR (Redwood et al. 2011).

Les défauts de réparation de l'ADN liés à des mutations du gène *LMNA* sont difficilement prévisibles. La diversité des pathologies causées par les mutations du gène *LMNA* suggère que l'impact sur les mécanismes de réparation de l'ADN pourrait être différent d'une mutation à l'autre.

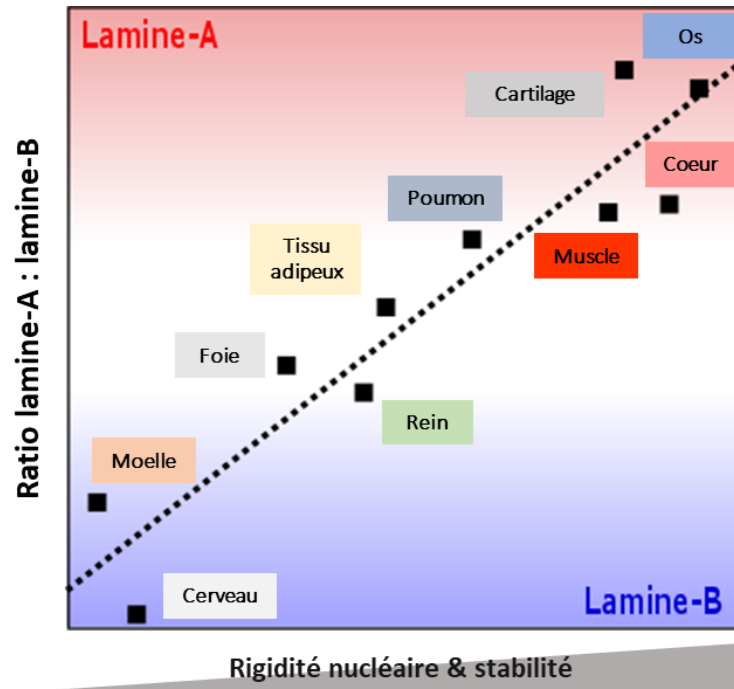
3. Téломères et lamines

Les télomères sont des séquences répétées non codantes situées à l'extrémité des chromosomes. Ils jouent un rôle protecteur permettant de pallier l'incapacité de répliquer les extrémités chromosomiques. Le raccourcissement des télomères est un processus physiologique responsable d'une augmentation des maladies liées au vieillissement (Blackburn, Epel, et Lin 2015). La fonction des télomères est cruciale dans la conservation et la réplication de l'information génétique. L'attrition des télomères entraîne progressivement une augmentation des défauts de l'ADN, un arrêt de la capacité répliquative des cellules induisant finalement une mort cellulaire. L'arrêt de la croissance cellulaire peut être compensé par une inhibition des facteurs suppresseurs de tumeur et induit une instabilité génomique (Hayashi 2018). Des études récentes ont mis en évidence le lien entre lamine A et télomères. Les lamines s'associent avec les protéines impliquées dans la réplication des télomères (Raz et al. 2008). Cette organisation permet de contrôler la mobilité et le métabolisme des télomères (De Vos et al. 2010). Un déficit en lamine de type A dans les cellules entraîne une augmentation de la mobilité des télomères dans le noyau et provoque un défaut de croissance des cellules par attrition des télomères (Decker et al. 2009).

4. Rigidité du noyau

Les analyses biochimiques et les tests de mécano-transduction réalisées sur différents types de cellules ont permis de caractériser leurs propriétés concernant la rigidité du noyau (Swift et al. 2013). Les lamines de type B possèdent des propriétés élastiques et permettent au noyau de se déformer et de revenir à sa forme originelle. Les lamines A permettent au noyau d'augmenter sa viscosité ce qui le rend plus rigide. Les propriétés physiques des noyaux peuvent être exprimés par un ratio entre la quantité des lamines de type A et des lamines de type B. Le ratio lamine A/ lamine B détermine ainsi les propriétés viscoélastiques du noyau. Ce ratio est élevé dans les cellules osseuses très rigides alors qu'il est diminué dans les cellules circulantes comme

les polynucléaires neutrophiles. Un ratio bas permet aux cellules et aux noyaux d'être plus déformables mais également plus fragiles (Schuldt 2013) (**Figure 5**).



5. Mécanotransduction

Figure 5 : Rigidité nucléaire des différents tissus en fonction du ratio lamine A/lamine B

**Adapté de Swift et al. 2013*

Les lamines jouent un rôle dans la transduction du signal mécanique provenant du cytoplasme vers le noyau. Les signaux biophysiques reçus au niveau de la membrane plasmique se transmettent via le cytosquelette et le complexe LINC (LInker of Nucloskeleton and Cytoskeleton) vers l'enveloppe nucléaire (Tapley et Starr 2013). Le complexe LINC est constitué des protéines SUN liées d'une part aux nesprines dans l'enveloppe nucléaire et aux lamines dans le nucléoplasme (Sosa et al. 2012). Les nesprines interagissent directement avec le cytosquelette. Le complexe LINC permet ainsi le lien entre le cytosquelette et le nucléosquelette et la transmission d'un signal physique entraînant une réponse permettant de moduler l'expression génique (Simon et Wilson 2011). Des études récentes ont montré que les signaux physiques permettent de réguler le niveau d'expression des lamines et de modifier les

propriétés du noyau et le niveau de différenciation de la cellule. Ces signaux induisent également des modifications de l'état de la chromatine et modulent l'accès aux facteurs de transcription (Uhler et Shivashankar 2017).

6. Lamine et cycle cellulaire

Lors de la division cellulaire, le noyau subit des modifications à la fin de la prophase pour permettre à l'information génétique de se séparer et de se répartir dans les deux cellules filles. L'enveloppe nucléaire se désagrège et entraîne la dissociation des pores nucléaires, le désassemblage de la lamina nucléaire et la formation de petites vésicules constituées de la membrane nucléaire. Les lamines subissent lors de la prophase une hyperphosphorylation induite par de nombreuses kinases permettant le désassemblage des filaments intermédiaires en dimères (Torvaldson, Kochin, et Eriksson 2015). Le domaine de la tête situé dans la partie N-terminale des lamines contient plusieurs sites de phosphorylation. Un site de phosphorylation interagit avec les protéines de type Cdk (Cyclin dependent kinase) et notamment la protéine Cdk1. Le domaine de la tête est crucial dans la formation des liaisons « head to tail » et la constitution des polymères de lamines (Machowska, Piekarowicz, et Rzepecki 2015). Des sites dits « mitotiques » sont ainsi phosphorylés dans les domaines N-terminal et C-terminal permettant le désassemblage de la lamina nucléaire. Les lamines A et C restent solubles pendant la mitose alors que les lamines de type B restent liées à l'enveloppe nucléaire qui se présente sous la forme de vésicules.

Lors de la télophase, les deux cellules filles se séparent et le noyau se reforme. Pendant cet événement, l'enveloppe nucléaire se reconstitue et la lamina nucléaire se reforme. Les lamines A et B sont déphosphorylées par l'intermédiaire de la protéine PP1 (proteïn phosphatase 1) (Heald et McKeon 1990). Les lamines déphosphorylées peuvent alors s'agréger en des structures plus complexes pour reconstituer la lamina nucléaire. De nombreuses études ont

montré l'implication des protéines SUMO agissant sur le domaine C-terminal des lamines dans ce processus (Moriuchi et al. 2016).

Le mécanisme permettant l'assemblage et le désassemblage des lamines pendant la division cellulaire reste encore largement non élucidé. Il existe néanmoins des interactions notamment avec les protéines SUN et les protéines à domaine LEM montrant le rôle prépondérant des modifications post-traductionnelles dans la désagrégation du noyau lors de la division cellulaire.

E. Partenaires protéiques des lamines

1. Interactions protéiques

Les lamines de type A et B interagissent de façon directe ou indirecte avec de nombreuses protéines nucléoplasmiques. Des analyses protéomiques sur le rat et l'homme ont identifié plus de 80 protéines liées à l'enveloppe nucléaire (Kubben, Voncken, et Misteli 2010). Ces protéines permettent aux lamines de jouer un rôle sur de nombreuses fonctions nucléaires dont l'organisation chromatinienne, la structure et l'intégrité du noyau, la mécanotransduction et la régulation du cycle cellulaire (Wilson et Foisner 2010). Les protéines de la famille LEM (LAP2, emerin, MAN1 domain) dont le domaine homonyme est très conservé au cours de l'évolution, permettent la fixation des histones et de la chromatine notamment via la protéine BAF (Barrier of Autointegration Factor) (K. K. Lee et al. 2000). Les lamines s'associent avec les protéines SUN au niveau de la lamina nucléaire. Les protéines SUN sont une des composantes du complexe LINC et permettent la transduction des contraintes physiques de l'environnement cellulaire vers le noyau. Ce lien permet une réponse adaptative de la cellule via une expression génique spécifique (Tzur, Wilson, et Gruenbaum 2006; Horn 2014).

Cette association est modulée selon les types cellulaires et tissulaires et pourrait expliquer les différents phénotypes imputés aux laminopathies. Ainsi, de nombreuses protéines transmembranaires ont été impliquées dans des pathologies où l'expression clinique est similaire à celle des pathologies liées aux lamines. En effet, les mutations de protéines nesprines, émerine et ZMPSTE24 entraînent respectivement des dystrophies musculaires et des dysplasies acro-mandibulaires. Le diagnostic des lipodystrophies familiales génétiques de type 2 (syndrome de Dunnigan) est lié à de nombreux gènes impliqués dans la différenciation des adipocytes et dans la maturation des adipocytes blancs. La compréhension des interactions entre les lamines et les différentes protéines nucléaires est cruciale dans la résolution de la physiopathologie des laminopathies (de Las Heras et al. 2017).

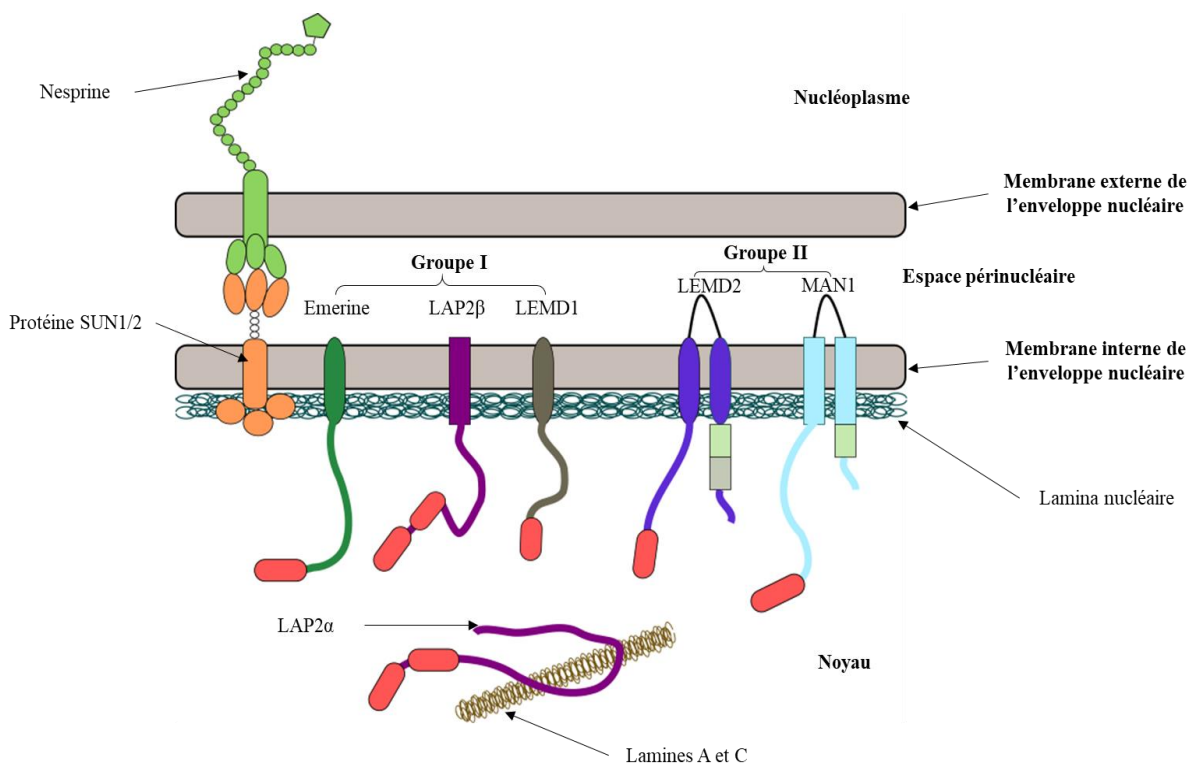


Figure 6 : Les différentes protéines à domaine LEM

Les protéines à domaine LEM du groupe I possèdent un domaine transmembranaire et un domaine LEM situé dans la région nucléoplasmique. La protéine LAP2 α est uniquement nucléoplasmique et s'associe avec les lamines A et C également nucléoplasmiques. Les protéines LEM du groupe II ont 2 domaines transmembranaires et possèdent un domaine LEM. Le domaine LEM permet l'association avec la chromatine et d'autres protéines nucléaires.

2. Protéines à domaine LEM

Les protéines à domaine LEM (LAP2/Emerin/MAN1) solubles ou fixées à l'enveloppe nucléaire interagissent principalement avec la lamina nucléaire, BAF1 et l'ADN (Brachner et Foisner 2011). Les protéines à domaine LEM sont divisées en 3 groupes selon leur structure (Kenneth K. Lee et Wilson 2004). Le groupe 1 comporte l'émerine, LEMD1 et LAP2 qui possèdent un domaine LEM à leur extrémité N-terminale et sont majoritairement ancrées dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire par leur domaine C-terminal. Seule LAP2 α est soluble dans le nucléoplasme (Caputo et al. 2006). Le groupe 2 se compose de MAN1 et LEMD2 et comprend 2 domaines transmembranaires ancrés dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et un domaine MSC (MAN1/Src1/C-terminal motif) se liant à l'ADN (Kondé et al. 2010). Le groupe 3 se compose des protéines Ankle (1,2 et 3) qui peuvent être soit solubles dans le nucléoplasme, soit ancrées dans le feuillet interne de l'enveloppe nucléaire. Elles comportent des domaines ankyrine répétés (**Figure 6**) (Dittrich et al. 2012; Brachner et al. 2012).

a. LAP2

Il existe de nombreuses isoformes de la protéine LAP2 issues de l'épissage alternatif du gène LAP2. La majorité des isoformes, dont LAP2 β , sont fixées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire contrairement à LAP2 α qui est soluble dans le nucléoplasme. Les protéines de type LAP interagissent respectivement avec l'ADN et la protéine BAF via le domaine LEM nucléoplasmique (Vlcek, Dechat, et Foisner 2001). LAP2 β interagit également avec les lamines de type B. Les protéines de type LAP jouent un rôle commun avec les autres protéines ancrées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire sur la liaison de l'hétérochromatine périphérique, le maintien de la structure du noyau et la régulation de la transcription des gènes (Brachner et Foisner 2014).

b. Emerine

L'émerine interagit avec de nombreuses protéines dont BAF, les lamines A et le nucléosquelette. La fonction de l'émerine est similaire aux autres protéines de type LEM ancrées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (Ostlund et al. 1999). Par sa liaison avec les protéines de type SUN, l'émerine joue un rôle dans la mécano-transduction. Le déficit d'émerine dans les fibroblastes de souris montre une altération de la réponse génétique quand les cellules sont soumises à un stress mécanique (Rowat, Lammerding, et Ipsen 2006). L'émerine est fortement exprimée dans le tissu musculaire et cardiaque. Des mutations dans le gène *EMD* ont été mises en évidence dans des cardiomyopathies et des dystrophies musculaires. Les études *in vitro* sur les cardiomyocytes *EMD*^{-/-} montrent une altération de l'architecture des disques intercalaires entraînant une anomalie de forme des myocytes. Cette altération est modulée la β -caténine et les jonctions adhérentes (Stubenvoll et al. 2015; Wheeler et al. 2010). L'émerine se lie également aux protéines nesprines et SUN et influence la structure de l'enveloppe nucléaire et le positionnement du centrosome (Salpingidou et al. 2007). D'autres interactions jouent un rôle lors de la mécano-transduction en modifiant la dynamique du cytosquelette d'actine. Comme la protéine LBR, l'émerine peut se lier via la protéine BANF1 à l'hétérochromatine (Berk, Tifft, et Wilson 2013).

c. MAN1

MAN1 est une protéine du groupe 2 de la famille des protéines LEM. Elle possède 2 segments transmembranaires à l'extrémité C-terminale et un fragment nucléoplasmique à l'extrémité N-terminale. Comme les autres protéines décrites ci-dessus, MAN1 interagit avec les lamines de type B et la protéine BAF1 (Mansharamani et Wilson 2005). MAN1 a déjà été impliqué dans des pathologies osseuses par des analyses de liaison et par séquençage haut-débit dans le syndrome de Buschke-Ollendorff et dans l'ostéopoeilie avec ou sans mélorhéostose (Hellemans et al. 2004; Y. Zhang et al. 2009; Mumm et al. 2007).

d. LBR

Le gène *LBR* (Lamin B Receptor) code pour la protéine du même nom située sur la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Sa taille est de 615 acides aminés et elle contient une région N-terminale nucléoplasmique et 8 domaines transmembranaires ancrés dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (**Figure 7**).

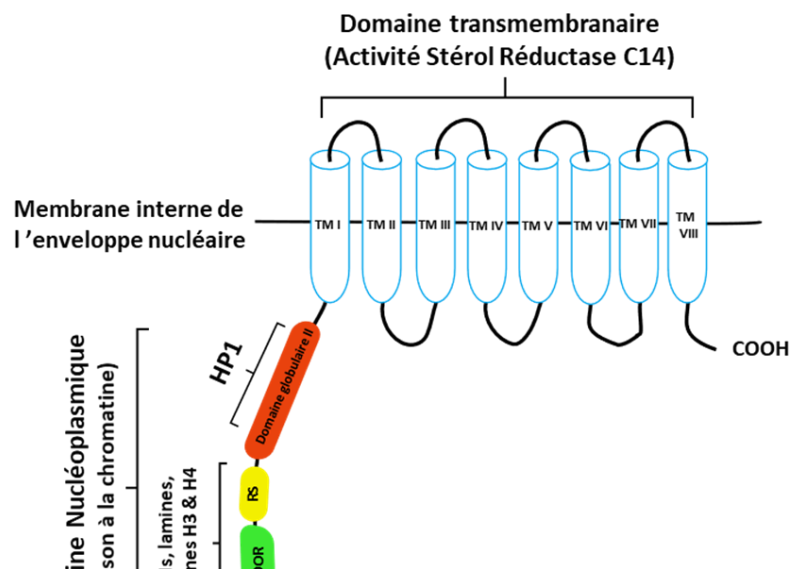


Figure 7 : Représentation schématique de la protéine LBR

Le domaine nucléoplasmique de la protéine LBR comporte 3 domaines permettant une liaison directe soit avec l'ADN, soit avec les histones, soit avec les lamines.

*Adapté de Nikolakaki & al. 2017

La protéine LBR possède trois domaines distincts dans la partie nucléoplasmique. Un domaine Tudor à l'extrémité N-terminale qui permet la liaison de la protéine LBR aux histones et un domaine RS riche en arginine et sérine pouvant se lier soit à l'ADN, soit aux lamines de type B (Giannios, Chatzantonaki, et Georgatos 2017; Hirano et al. 2012; Ye et Worman 1994). Le dernier domaine HP1, globulaire peut également se lier à l'ADN. Enfin, la protéine LBR

possède un domaine stérol réductase impliquant un rôle dans la synthèse du cholestérol (Tsai et al. 2016). L'activité stérol réductase agit sur la structure de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire en recrutant des radeaux lipidiques (Giannios, Chantzantoni, et Georgatos 2017; Hirano et al. 2012). Ces trois domaines peuvent permettre l'ancrage de l'hétérochromatine ou des lamines à la protéine LBR. La protéine LBR est une des composantes clés de l'architecture chromatinienne notamment dans les cellules à des stades précoces du développement en liant l'hétérochromatine à la périphérie du noyau (Ye et Worman 1994; Solovei et al. 2013).

3. Le complexe LINC

a. Généralités

Le complexe LINC est responsable de plusieurs fonctions dont le positionnement et la forme du noyau, le maintien de la connexion du noyau et du centrosome, les mécanismes de réparation de l'ADN, la migration cellulaire, et le positionnement des chromosomes lors de la méiose. Il a un rôle également dans la perception et la transformation des contraintes physiques subies par la cellule en un signal biologique ou mécano-transduction. Le complexe LINC permet d'établir le lien entre le cytosquelette et les protéines du noyau via les protéines nesprines et SUN (Hiraoka et Dernburg 2009; Lawrence et al. 2016; Lei et al. 2012; X. Zhang et al. 2009; Nishioka et al. 2016; Crisp et al. 2006) (**Figure 8**).

b. Les protéines nesprines

Les nesprines sont des protéines constitutives de l'enveloppe nucléaire ancrées à la membrane interne. Elles sont un élément clé du complexe LINC qui permet d'établir un lien entre le cytosquelette et le nucléosquelette. Les protéines de type nesprine forment une famille et sont codées par les gènes *SYNE1*, *SYNE2*, *SYNE3*, *SYNE4* (King et al. 2014). Ces gènes sont situés sur le chromosome 6 pour *SYNE1*, 14 pour *SYNE2* et *SYNE3*, et 19 pour *SYNE4*. Les protéines de la famille nesprine se composent d'un domaine globulaire en N-terminal ou domaine d'homologie à la calponine permettant la liaison aux filaments d'actine, et un domaine transmembranaire situé en C-terminal ou domaine KASH pour Klarsicht/ANC-1/Syne homology qui permet la liaison aux protéines de la famille SUN (Rajgor et Shanahan 2013). Ces deux domaines permettant les interactions protéiques sont séparés par des séquences répétées ou Spectrin repeat. Les différents gènes codant pour les nesprines produisent par épissage alternatif de nombreuses isoformes de longueur variable ayant des fonctions légèrement différentes et exprimées selon le stade de différenciation et le type cellulaire (Horn 2014) (**Figure 8**).

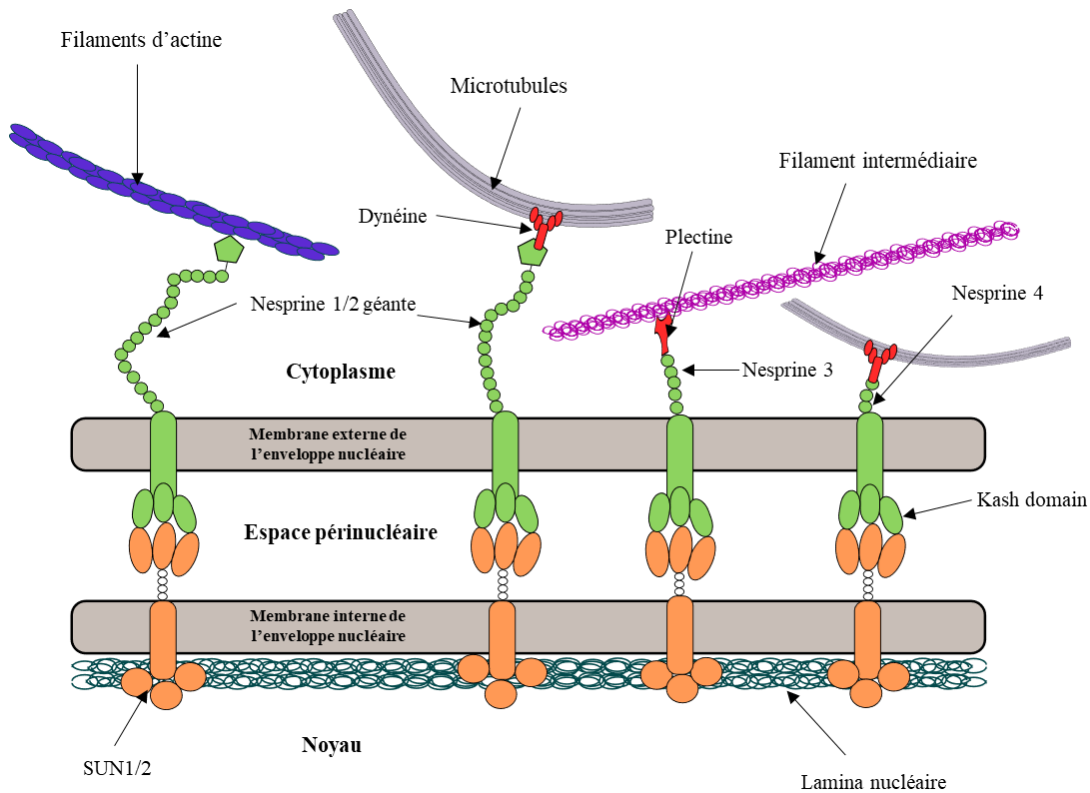


Figure 8 : Représentation schématique du complexe LINC

Les nesprines s'associent avec les protéines SUN pour former le complexe LINC. Il est constitué des nesprines (vert) et des protéines SUN (orange). Dans sa forme classique, le complexe LINC se forme par l'association de 3 protéines nesprines et de 3 protéines SUNs.

c. Les différents types de nesprines

Nesprine 1 et Nesprine 2 sont codées respectivement par les gènes *SYNE1* et *SYNE2*. Elles ont été les deux premières protéines identifiées contenant un domaine KASH. Ces deux protéines comprennent un domaine de liaison à l'actine situé en N-terminal, des domaines SR et un domaine KASH en C-terminal (Rajgor et Shanahan 2013; Gundersen et Worman 2013). L'isoforme géante de la nesprine 1 et la nesprine 2 ont respectivement une taille d'environ 1.2MkDa et 800kDa. De nombreuses isoformes plus courtes existent et sont obtenues par épissage alternatif, leur rôle serait proche des isoformes géantes (Yu et al. 2011). Les nesprines sont produites au niveau du réticulum endoplasmique et s'intègrent à la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Les deux gènes *-SYNE3* et *SYNE4* -codent respectivement pour des protéines plus courtes : la nesprine 3 (110kDa) et la nesprine 4 (43kDa) (Wilhelmsen et al.

2005). La nesprine 3 se lie via son domaine de liaison à l'actine et à la plectine. La plectine est une protéine de la famille des plakines qui contient un domaine de liaison à l'actine et un domaine permettant la fixation aux filaments intermédiaires présents dans le cytosquelette (Ketema et al. 2013). Les nesprines 4 se fixent aux microtubules via les kinésines, elles ont un rôle dans les cellules épithéliales, dans la polarisation de la cellule en agissant sur le positionnement et la dynamique des microtubules via le centre d'organisation des microtubules (Roux et al. 2009).

d. Les protéines SUN

Les protéines SUN sont ancrées dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et forment avec les protéines de la famille nesprine le complexe LINC. Il existe 5 gènes codant pour 5 protéines SUN : SUN1, SUN2, SUN3, SUN4, SUN5. Les protéines SUN1 et SUN2 sont ubiquitaires (Tapley et Starr 2013) contrairement aux protéines SUN3, SUN4, SUN5 qui sont exprimées spécifiquement dans les testicules (Göb et al. 2010; Frohnert, Schweizer, et Hoyer-Fender 2011). Les protéines SUN sont composées d'un domaine C-terminal situé dans l'espace périnucléaire pouvant se lier au domaine KASH des protéines nesprines, un domaine transmembranaire et un domaine N-terminal localisé dans le noyau pouvant se lier soit avec les lamines composant la lamina nucléaire, soit avec d'autres protéines nucléaires. Les gènes SUN1 et SUN 2 produisent de nombreuses isoformes obtenues par épissage alternatif (Nie et al. 2016). Ces isoformes ont de nombreux rôles, pas encore tous élucidés. Par exemple, SUN1 joue un rôle dans le positionnement des télomères lors de la méiose et permet leur ancrage à l'enveloppe nucléaire (Horn et al. 2013). Récemment, un rôle de SUN1 et SUN2 a été mis en évidence dans les mécanismes de réparation des cassures de l'ADN. Ainsi, il a été montré que les protéines SUN interagissent avec le complexe DNA-PK nécessaire à la promotion des mécanismes de réparation de l'ADN (Lei et al. 2012).

e. Fonction du complexe LINC

Le complexe LINC établit un lien entre le cytosquelette et les protéines du noyau via les protéines nesprines et SUN. Il permet la transmission des forces mécaniques subies par la cellule au noyau pour induire une réponse cellulaire adaptée. Les protéines nesprines sont associées au cytosquelette dans le cytoplasme via leur extrémité N-terminale globulaire et aux protéines SUN dans l'espace périnucléaire via le domaine KASH situé à l'extrémité C-terminale. Les protéines SUN s'associent avec les protéines enchâssées dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et les lamines constituant la lamina nucléaire (Horn 2014).

Le complexe LINC est composé selon les études de cristallographie effectuées sur la liaison KASH/SUN2 de trois protéines nesprines et trois protéines SUN (Sosa et al. 2012; W. Wang et al. 2012). La connexion s'effectue entre le domaine KASH de la protéine nesprine et le domaine SUN. Le domaine KASH se lie comme un crochet au domaine SUN situé à l'extrémité C-terminale. Les protéines SUN se composent d'une région en super hélice α permettant la formation de trimères de protéines SUN. Ces régions en superhélice α ont des propriétés élastiques suggérant la capacité des protéines SUN à subir une contrainte physique induite par le cytosquelette (Arsenovic et al. 2016).

Le complexe LINC peut être constitué de différentes combinaisons d'hexamères nesprine/SUN (Mans et al. 2004). D'une autre façon, le complexe LINC peut être produit par une association trimère/dimère ou trimère/monomère soulevant la possibilité de former des structures plus complexes (Lu et al. 2008).

Les régions nucléoplasmiques des protéines SUN1 et SUN2 interagissent directement avec les lamines A, mais faiblement avec les lamines de type B. Des études sur des fibroblastes embryonnaires de souris *Lmna*^{-/-} ont démontré l'importance de l'interaction entre la lamine A et la protéine SUN2. En effet, SUN2 est délocalisée en l'absence de lamine A alors qu'aucun effet n'est constaté sur SUN1 (Q. Zhang et al. 2007). La lamine A interagit plus fortement avec

SUN1. Ainsi, les protéines SUN et les lamines A interagissent de façon coordonnée et dans des mécanismes cellulaires communs. Les conséquences de la liaison entre SUN1 et lamine A sont inconnues mais cette association peut être régulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation et/ou sumoylation) (Cain et al. 2014; Chang et al. 2015). Ces interactions peuvent ainsi être affectées par le complexe LINC. Des études sur des cellules *Lmna*^{-/-} murines ont montré la relocalisation de nesprine 2 dans le réticulum endoplasmique. Les lamines A et les protéines SUN influenceraient en retour la liaison entre le domaine KASH des nesprines et les protéines SUN (Libotte et al. 2005).

Le complexe LINC permet ainsi la transmission au noyau du stress mécanique provenant du milieu extérieur sur la membrane par l'intermédiaire du cytosquelette. De nombreuses études montrent le lien entre le cytosquelette et le complexe LINC induisant le repositionnement du noyau et la répartition des forces subies par celui-ci. Les lamines A/C jouent un rôle particulier dans les propriétés du noyau (Philip et Dahl 2008). La déplétion des lamines A et C entraîne une déformabilité accrue du noyau. Les lamines A et le complexe LINC jouent ainsi un rôle prépondérant dans la stabilité et la rigidité du noyau. D'autres expériences sur la phosphorylation des lamines montrent une modification des propriétés viscoélastiques du tissu suggérant un rôle dans la rigidité du noyau et sur l'expression génique (Swift et al. 2013). L'application d'une force sur la protéine nesprine 1 entraîne l'augmentation de la rigidité du noyau médiée par l'émerine (Guilluy et al. 2014).

Ainsi, le complexe LINC joue un rôle majeur dans la cellule en permettant de maintenir une communication entre le noyau et le nucléosquelette. Le complexe LINC et son association avec les lamines tend à montrer la dynamique de la réponse du noyau aux forces mécaniques subies par la cellule (Guilluy et Burridge 2015).

III. Le tissu adipeux

Dans cette partie, nous décrirons les spécificités du tissu adipeux. Dans un premier temps, nous aborderons le rôle du tissu adipeux et son origine. Dans un deuxième temps, nous décrirons les différents types de tissu adipeux. Enfin, nous détaillerons les spécificités du tissu adipeux chez l'adulte et chez l'adolescent.

A. Généralités

Le tissu adipeux constitue chez l'adulte entre 10 et 25% de la masse corporelle. Ce pourcentage varie en fonction du sexe et atteint 10 à 15% chez les hommes et 15 à 25% chez les femmes. Le tissu adipeux est un organe endocrine innervé, vascularisé, et est constitué de nombreuses cellules dont des macrophages, des fibroblastes, des cellules immunitaires, des cellules endothéliales et des adipocytes. Ces derniers constituent l'unité fonctionnelle du tissu adipeux et sont issus de pré-adipocytes. Le tissu adipeux est responsable de plusieurs fonctions permettant de maintenir la balance énergétique de l'organisme. Il stocke l'énergie sous forme de triglycérides pendant les périodes de prise alimentaire et libère l'énergie durant les périodes de jeûne. Le tissu adipeux est également un tissu sécrétant de nombreuses molécules, de façon paracrine et endocrine, qui maintiennent son homéostasie. Le tissu adipeux constitue une barrière physique permettant une isolation thermique. Il est également un amortisseur résistant aux contraintes mécaniques du milieu extérieur (Dardour 2012).

On distingue chez l'Homme trois types de tissus adipeux présentant des caractéristiques cytologiques et fonctionnelles différentes. Le tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun et le tissu adipeux beige (Wu et al. 2012).

B. Origine du tissu adipeux

Les cellules du tissu adipeux dérivent de cellules mésenchymateuses multipotentes pour donner le tissu adipeux blanc ou le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux brun se développe dès le stade fœtal alors que le tissu adipeux blanc apparaît quelques jours après la naissance. Les cellules mésenchymateuses se différencient via différents facteurs de transcription et prennent une forme sphérique pour devenir des adipoblastes (Rosen et MacDougald 2006). Les adipoblastes deviennent des pré-adipocytes et terminent ainsi leur différenciation. L'adipogenèse consiste en la transition de pré-adipocytes en adipocytes matures (Otto et Lane 2005). Dans un premier temps, les pré-adipocytes se multiplient et se différencient grâce aux facteurs de transcription PPAR γ /C/EBP- α en adipocytes matures (Q. A. Wang et al. 2013; Tang et Lane 2012) (**Figure 9**).

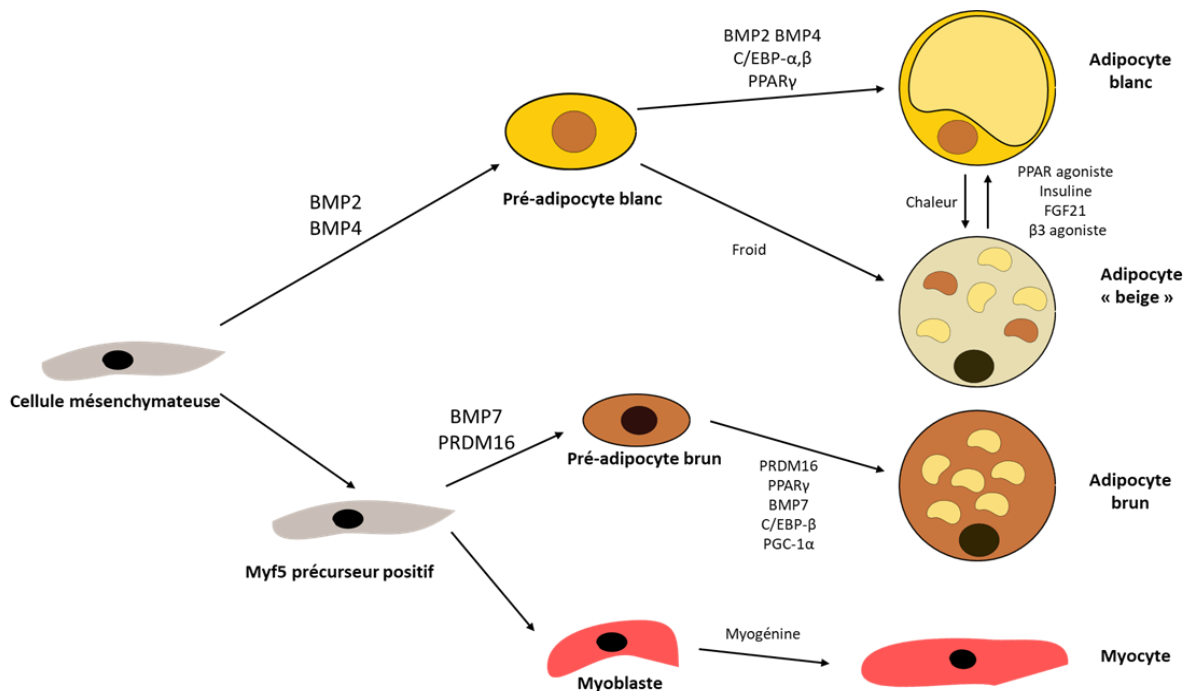


Figure 9 : Développement des différents types de tissu adipeux

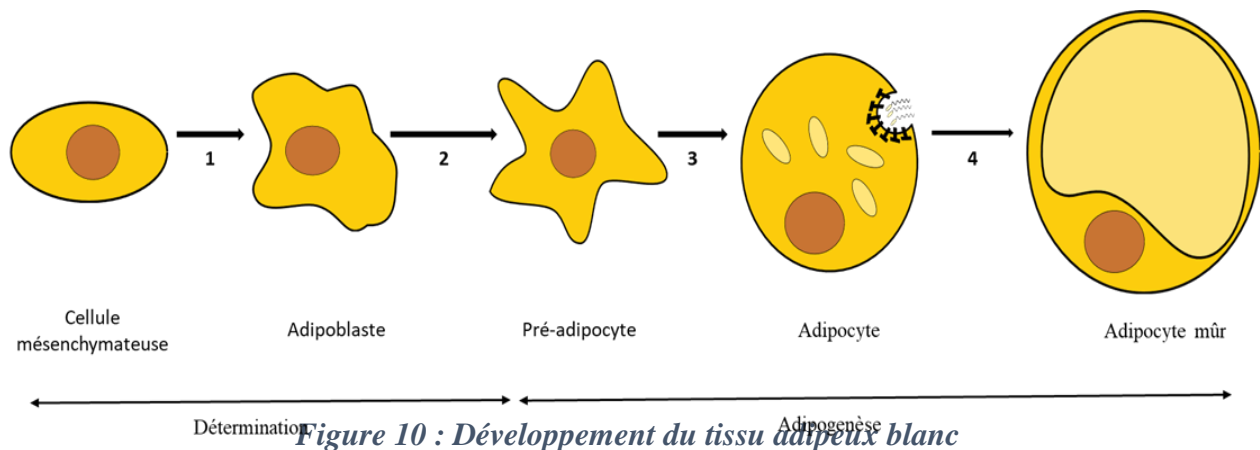
Le tissu adipeux se développe à partir de cellules mésenchymateuses. Le tissu adipeux blanc est majoritaire chez l'homme, il se développe sous l'influence de protéines spécifiques. Les pré-adipocytes blancs peuvent donner, sous l'effet de l'environnement et de facteurs spécifiques, les adipocytes beiges. Le tissu adipeux brun présent à moins de 1% chez l'homme est issu de cellules mésenchymateuses Myf5 positives. Le tissu adipeux brun produit principalement de la chaleur à partir des acides gras grâce à une machinerie mitochondriale spécifique.

*Adapté de Reddy et al. 2014.

C. Les différents types de tissu adipeux

1. Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est majoritaire chez l'homme et se répartit sur la totalité du corps. On distingue le tissu adipeux viscéral qui entoure les organes et a un rôle structurel, du tissu adipeux sous-cutané qui joue un rôle dans le stockage de l'énergie et constitue une barrière physique permettant de résister aux variations de température et aux chocs (Heid et Keenan 2005). Le tissu adipeux blanc est constitué majoritairement d'adipocytes blancs qui sont capables de stocker l'énergie sous forme de triglycérides. Les adipocytes ont une forme sphérique et sont constitués d'une gouttelette lipidique uniloculaire. Leur taille peut varier de 1 à 200 μ m selon la quantité de triglycérides stockés (Murphy 2012) (**Figure 10**).



2. Le tissu adipeux brun

Les adipocytes bruns contiennent plusieurs mitochondries et plusieurs gouttelettes lipidiques (Cypess et al. 2009). Contrairement aux adipocytes blancs, ils convertissent l'énergie en chaleur via les mitochondries. Ils expriment spécifiquement le gène *UCPI* qui permet ce processus (Brand et Nicholls 2011). Les adipocytes bruns sont principalement exprimés chez le nouveau-né et permettent de maintenir la température corporelle. En effet, le système nerveux moteur n'est pas encore complètement développé pour induire une thermorégulation efficace. Le tissu adipeux brun se retrouve à l'âge adulte au niveau supra claviculaire, para-vertébral et supra-rénal. Il représente environ 1% du tissu adipeux total (Enerbäck 2010) (**Figure 10**).

3. Le tissu adipeux beige

Récemment, les chercheurs ont mis en évidence un troisième type de tissu adipeux : le tissu adipeux beige qui comprend les caractéristiques des adipocytes blancs et bruns. Les adipocytes beiges présentent une gouttelette lipidique uniloculaire et un profil d'expression génique similaire aux adipocytes blancs (Sharp et al. 2012). Lorsque le tissu adipeux subit une stimulation au froid, ces cellules subissent un procédé de trans-différenciation entraînant une modification de l'expression génique et des organites présents dans la cellule (Waldén et al. 2012). Les cellules adipocytaires beiges présentent alors des gouttelettes lipidiques multiloculaires et expriment des gènes comme *UCPI* favorisant la création de chaleur via les acides gras stockés. Ce processus est réversible quand les cellules sont soumises à des stimuli de chaleur, elles retournent, dès lors, à un état basal blanc (Wu et al. 2012) (**Figure 10**).

D. Fonctions du tissu adipeux

1. Lipolyse et lipogenèse

La lipolyse permet de libérer l'énergie stockée sous forme de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes, en libérant des acides gras libres dans la circulation sanguine et lymphatique. La lipolyse est induite lors d'un besoin d'énergie de la part de l'organisme à distance des prises alimentaires. Un signal adrénérgique via des récepteurs α_3 permet d'activer la protéine PKA qui a pour rôle de phosphoryler la périlipine située à la surface des gouttelettes lipidiques. La périlipine phosphorylée permet de modifier la membrane des gouttelettes et de permettre aux lipases de libérer les acides gras qu'elles contiennent. Les triglycérides sont clivés principalement par les lipases LIPE et ATGL. Les acides gras libres sont disponibles pour la synthèse d'ATP (Bolsoni-Lopes et Alonso-Vale 2015).

La lipogenèse permet le stockage des acides gras libres sous formes de triglycérides. Elle a lieu en phase postprandiale et permet de stocker l'énergie apportée par le bol alimentaire. La lipogenèse est induite par l'internalisation des acides gras libres par des cavéoles. Elle est favorisée par l'insuline qui induit l'absorption du glucose et des acides gras et inhibe la lipolyse. Le rôle de l'insuline dans la lipogenèse a été démontrée chez des souris KO pour les récepteurs à l'insuline sur le tissu adipeux qui montrent un syndrome lipodystrophique très marqué (Rogne et Taskén 2014).

Le tissu adipeux est sous le contrôle du système nerveux sympathique et parasympathique qui agit sur le métabolisme des acides gras et la sensibilité à l'insuline. Les adipocytes blancs possèdent des récepteurs β et α -adrénérgiques. Le tissu adipeux sous-cutané présente majoritairement des récepteurs β_3 capables lorsqu'ils sont stimulés de favoriser la lipolyse et la mobilisation des acides gras. L'équilibre entre la présence des récepteurs β et α -adrénérgiques

permet de maintenir l'équilibre du métabolisme lipidique (Esteve Ràfols 2014; McGown, Birerdinc, et Younossi 2014).

Le tissu adipeux possède des récepteurs à l'insuline qui induisent sous stimulation d'insuline une action antilipolytique et le stockage du glucose sous forme de lipides. Cet équilibre est soumis à la prise alimentaire et aux périodes de jeûne (Smith et Kahn 2016). Il se dégrade dans les cas d'anomalie du tissu adipeux. L'insulino-résistance entraîne la dérégulation du métabolisme lipidique favorisant la lipogenèse et la faible mobilisation des triglycérides (Esteve Ràfols 2014).

2. Fonction endocrine

Le tissu adipeux est considéré comme un organe endocrine sécrétant de nombreuses hormones nommées adipokines. Les adipokines contrôlent plusieurs fonctions grâce à une sécrétion mérocrine, paracrine et/ou endocrine. Elles régulent notamment la prise alimentaire en agissant sur le métabolisme lipidique et l'homéostasie du tissu adipeux (McGown, Birerdinc, et Younossi 2014).

Parmi les adipokines, la leptine joue un rôle directement sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en induisant la sécrétion de peptides anorexigènes induisant l'effet de satiété. Le taux plasmatique de cette hormone est augmenté dans le syndrome métabolique et diminué dans les lipodystrophies familiales partielles dues aux gènes *PPAR γ* et *LMNA* (Paz-Filho, Mastronardi, et Licinio 2015). L'apport de leptine sous forme d'un analogue synthétique (métréleptine) permet d'améliorer les désordres métaboliques dont le taux de triglycérides circulants et l'insulino-résistance chez les patients atteints de lipodystrophie (Brown et al. 2018).

3. Tissu adipeux et hormones sexuelles

Lors de l'adolescence, la puberté induit le développement des organes reproducteurs et la sécrétion des hormones sexuelles. Le tissu adipeux possède de nombreux récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes (Law et al. 2014; Karastergiou 2015). Pendant cette période, le développement du tissu adipeux est donc modifié et se caractérise à l'âge adulte, par une différence de la quantité et de répartition de masse grasse entre les hommes et les femmes. Chez les hommes, la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig dans les testicules entraîne le développement de la masse musculaire et une activité lipolytique importante. Elle permet également d'inhiber la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes dans des régions spécifiques du corps (hanches et cuisses notamment). Chez les femmes, l'absence d'augmentation de sécrétion de testostérone et la sécrétion des œstrogènes provoquent l'effet opposé. Ainsi, les femmes développent une croissance du tissu adipeux au niveau des hanches et des cuisses. Les œstrogènes inhibent la lipolyse, potentialisent la lipogenèse et entraînent la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes.

La répartition des graisses est considérée androïde si elles se situent plutôt sur l'abdomen. Au contraire, la répartition gynoïde correspond à des graisses situées majoritairement au niveau des hanches et des cuisses.

IV. Les laminopathies

Les mutations du gène *LMNA* codant pour les lamines A et C sont responsables de pathologies appelées laminopathies. Plus de 500 mutations ont été mises en évidence jusqu'à présent causant une dizaine de pathologies extrêmement variées (Gruenbaum et Foisner 2015). Ces pathologies peuvent toucher un tissu spécifique (tissu adipeux, tissu musculaire, nerf périphérique) ou plusieurs tissus entraînant une atteinte multi-systémique. Cette hétérogénéité clinique s'accompagne d'une diversité génétique impliquant des localisations et des types de mutation variés (Worman et Bonne 2007). Dans un premier temps, nous allons décrire les différentes laminopathies tissu-spécifiques puis les laminopathies multi-systémiques dans une deuxième partie. Il est nécessaire de préciser que les laminopathies multi-systémiques peuvent être issues de mutations du gène *LMNA* et sont dites « primaires ». Les laminopathies dites « secondaire » sont issues de mutations du gène *ZMPSTE24* impliquée dans la maturation des différents types de lamine. Nous pouvons présenter succinctement les laminopathies « acquises » entraînant un vieillissement accéléré indépendant d'une cause génétique. C'est le cas des laminopathies iatrogènes induites par un traitement anti-VIH par inhibiteurs de protéase. Récemment, un lien a été établi entre ces molécules et l'enzyme *ZMPSTE24* mettant en évidence les cause de vieillissement accéléré chez les patients.

A. Les laminopathies tissu-spécifiques

1. Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires constituent un groupe de pathologies héréditaires entraînant une faiblesse progressive des muscles striés squelettiques. En 1999, l'équipe de Gisèle Bonne a mis en évidence pour la première fois, l'implication du gène *LMNA* dans une forme autosomique dominante de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (G. Bonne et al. 1999). Depuis, de nombreuses mutations dans le gène *LMNA* ont été mises en évidence entraînant différents types de dystrophies musculaires (Gisèle Bonne et Quijano-Roy 2013) (**Figure 11**).

Trois principaux phénotypes de dystrophies musculaires ont été décrits liés à des mutations du gène *LMNA* et constituent un continuum clinique. Ces trois phénotypes peuvent être associés à des anomalies cardiaques dont l'âge de survenue est plus ou moins tardif selon les patients.

Le premier phénotype décrit est la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss de type 2 qui apparaît entre 20 et 30 ans (Puckelwartz et McNally 2011). Elle se caractérise cliniquement par une triade de symptômes : faiblesse musculaire de la ceinture scapulo-péronéale, contractures au niveau de la cheville, du coude et de la colonne vertébrale, et présence d'anomalies de la conduction cardiaque associée à une cardiomyopathie dilatée (G. Bonne et al. 1999). Le mode de transmission est autosomique dominant dans la plupart des cas mais peut être récessif ou dû à un mosaïcisme.

La dystrophie musculaire des ceintures ou limb girdle muscular distrophy (LGMD) constitue le deuxième phénotype impliquant le gène *LMNA*. La LGMD1B se définit par une atteinte musculaire prédominante au niveau des ceintures scapulaire et pelvienne qui s'accroît sur les muscles distaux. La LGMD1B peut s'accompagner d'anomalies cardiaques. L'âge de survenue se situe entre 30 et 40 ans (Wicklund et Kissel 2014).

Le troisième phénotype, le plus sévère, est regroupé sous le nom de « LMNA-MD ». Il est dû à l'âge précoce d'apparition de la maladie et sa variabilité clinique. L'âge de survenue de la maladie se situe vers la deuxième année de vie (Mercuri et al. 2004). Deux formes ont été observées et diffèrent selon la gravité de l'atteinte musculaire (D'Amico et al. 2005), l'une sévère où on observe une absence ou un faible développement moteur se compliquant par un arrêt respiratoire, et une autre plus modérée qui se caractérise par une faiblesse musculaire progressive du squelette axial. (Quijano-Roy et al. 2008). Cette myopathie peut évoluer dans le temps vers l'un des deux phénotypes décrits précédemment (LGMD1B ou EDMD2) mais présente peu d'atteinte cardiaque.

2. Cardiomyopathies dilatées

Les cardiomyopathies dilatées sont la première cause de transplantation cardiaque et la troisième cause d'arrêt cardiaque aux Etats-Unis (Maron et al. 2006). Elles sont dues à une dilation du ventricule gauche ou des deux ventricules cardiaques et s'accompagnent d'une diminution de la fraction d'éjection systolique en l'absence d'autres causes mécaniques (McKenna, Maron, et Thiene 2017). 20 à 50% des cas de cardiomyopathies dilatées sont idiopathiques ou ont une cause familiale supposée mais sans cause moléculaire identifiée (Hershberger, Hedges, et Morales 2013). Près de 60 gènes ont été associés à cette pathologie et un mode de transmission principalement autosomique dominant est décrit (J. Haas et al. 2015). Six pourcent des cardiomyopathies dilatées sont associées au gène *LMNA* (Fatkin et al. 1999). Les patients porteurs de certaines mutations dans le gène *LMNA* présentent 66% de risques de développer une cardiomyopathie dilatée entre 20 et 40 ans. Ce nombre est de 100% après 60 ans (Captur et al. 2017). Dans une même famille, les porteurs d'une même mutation expriment la pathologie à des degrés variables (Schreiber et Kennedy 2013). Ces variations ne sont pas encore expliquées et peuvent être due à de nombreux facteurs comme par exemple l'association à d'autres mutations sur d'autres gènes. Les patients atteints de mutations du gène *LMNA*

peuvent également présenter des phénotypes chevauchants pouvant allier une atteinte cardiaque, musculaire et une lipodystrophie (Araco et al. 2017) (**Figure 11**).

3. Maladie de Charcot Marie-Tooth

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) fut décrite pour la première fois en 1886. C'est la neuropathie périphérique héréditaire la plus fréquente (1/2500 naissances). Elle constitue en fait un groupe de neuropathies périphériques héréditaires sensitivomotrices n'influant pas sur l'espérance de vie (Abe et al. 2011). Elles se caractérisent par une faiblesse et une atrophie musculaire progressive prédominante au niveau des membres inférieurs. Cliniquement, les patients présentent une déformation des mains et des pieds, des crampes, une perte de la sensibilité et une diminution voire une abolition des réflexes (**Figure 11**).

La CMT se caractérise par une grande hétérogénéité clinique et génétique. A ce jour, plus de 80 gènes ont été mis en évidence (Jerath et Shy 2015).

En 1999, une étude sur 24 familles non apparentées originaires du Maroc et d'Algérie incluant 40 patients atteints de CMT de forme axonale, a montré un déséquilibre de liaison dans le chromosome 1 suggérant un possible effet fondateur (Bouhouche et al. 1999). En 2002, une mutation du gène *LMNA* situé sur le chromosome 1 a été mise en évidence. Il s'agit d'une mutation homozygote faux-sens c.892C>T (p.R298C) au niveau de l'exon 5 (De Sandre-Giovannoli et al. 2002). Les patients peuvent présenter malgré une mutation commune une variabilité interfamiliale et intrafamiliale, induisant une évolution variable de la maladie de Charcot Marie-Tooth. Les différents modèles cellulaires in vitro montrent une diminution du taux de lamine A ainsi que l'apparition d'anomalies nucléaires. Le modèle de souris exprimant la même mutation présente une diminution de la vitesse de conduction nerveuse et une diminution de l'excitabilité des cellules nerveuses. Des études montrent que la diminution de la lamine A induit une diminution de quantité du facteur de transcription JUN (González et al.

2008). Le facteur JUN régule négativement la myélinisation et l'apoptose des cellules nerveuses et il est associé à de nombreuses affections neurodégénératives (González et al. 2008).

B. Les laminopathies multi-systémiques

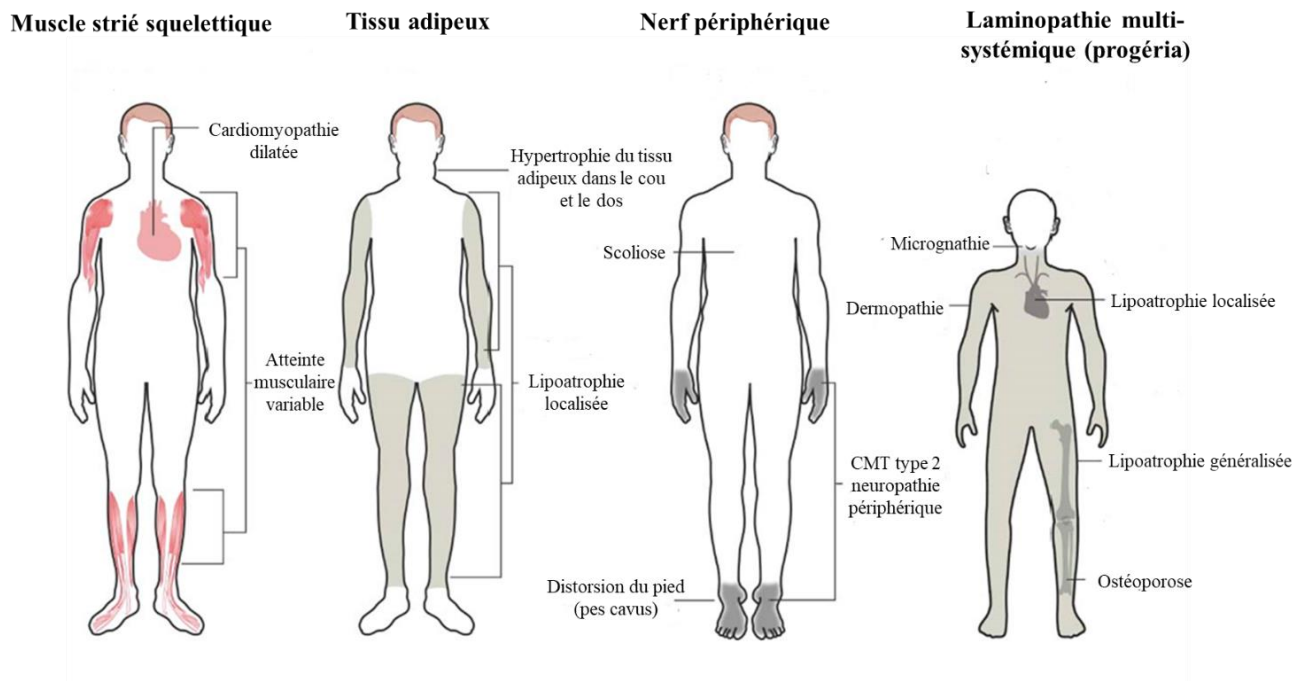


Figure 11 : Description clinique des laminopathies tissu-spécifiques et multi-systémiques

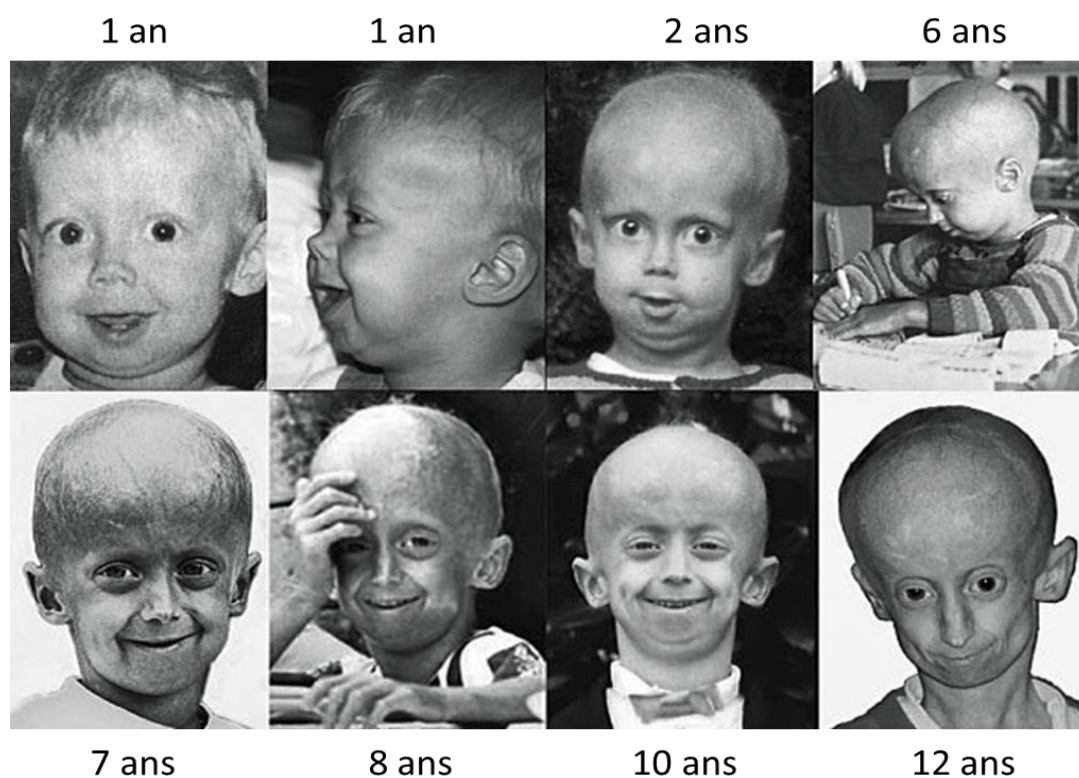
* Adapté de Worman et al. 2012

1. La progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS)

La progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une maladie génétique rare survenant tôt dans l'enfance et entraînant un décès prématuré dans l'adolescence (Eriksson et al. 2003). Elle a été décrite pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle, en 1886 par le Pr. Hutchinson et en 1895 par le Pr. Gilford sur un deuxième cas (Hutchinson 1886; Gilford 1897). En 2003, 2 équipes ont incriminé pour la première fois le gène *LMNA* comme responsable d'HGPS (De Sandre-Giovannoli et al. 2003; Eriksson et al. 2003). Au 1^{er} octobre 2016, un recensement international comptait 140 individus atteints de progéria. La prévalence est de 1 cas pour 20 millions d'individus selon les chiffres établis par la Progeria Research Foundation®. La progéria se caractérise par un vieillissement accéléré lié à l'accumulation d'un variant toxique

de la lamine A, la progérine (Eriksson et al. 2003; De Sandre-Giovannoli et al. 2003). C'est une pathologie multi-systémique dans laquelle on retrouve des défauts du tissu cardiaque, du tissu osseux, des muscles, de la peau (Gordon et al. 2014). Les enfants paraissent normaux à la naissance. Les signes cliniques apparaissent vers l'âge de 2 ans avec une perte d'élasticité de la peau, une voix haut-perchée, des lésions osseuses pouvant entraîner des fractures, une calvitie avec apparition du réseau veineux superficiel (**Figure 12**).

Ils développent un déficit de poids et de taille qui s'accompagne d'un diabète de type II et d'anomalies du bilan lipidique (Domínguez-Gerpe et Araújo-Vilar 2008). La présence d'une ostéolyse entraîne de nombreuses anomalies articulaires et osseuses au niveau des clavicules,



de la mandibule et des membres inférieurs. Les patients ne présentent aucun déficit intellectuel.

Figure 12 : Evolution de la dysmorphie faciale chez des patients atteints de Progéria de Hutchinson Gilford entre l'âge de 1 an et 12 ans.

L'espérance de vie se situe entre 10 et 20 ans avec un âge médian de 14.6 ans (Merideth et al. 2008). Le décès est dû dans la majorité des cas à des anomalies cardiaques et vasculaires induisant un syndrome coronarien aigu. Les autres cas de décès ont été reliés à des

complications post-chirurgicales, des infections, des convulsions et d'autres causes systémiques (Muchir et Worman 2010).

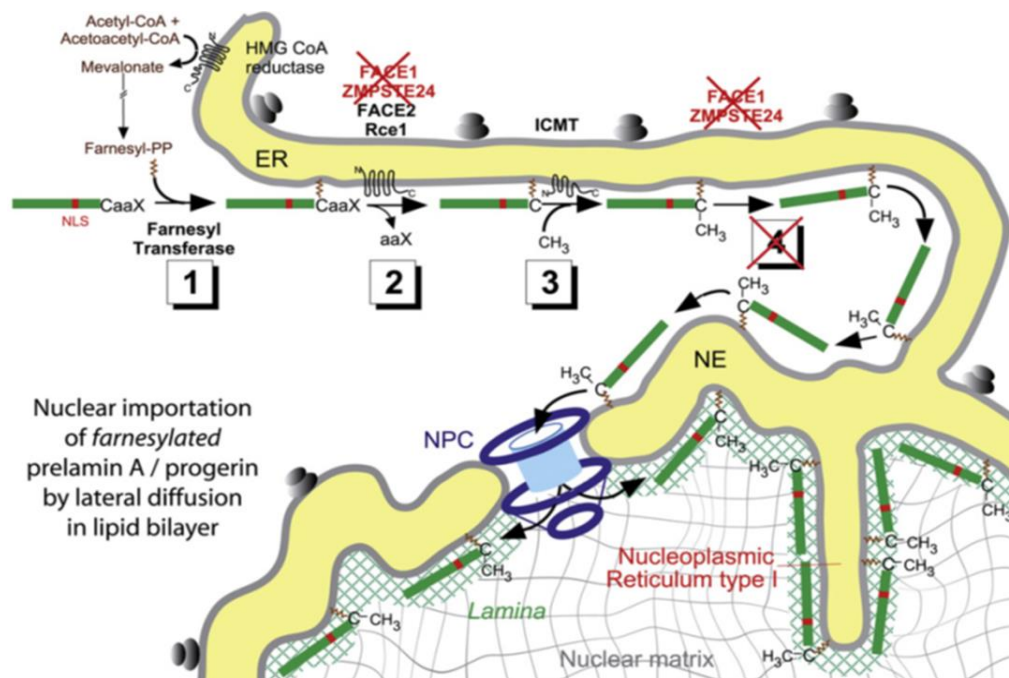
Les recherches ont mis en évidence une mutation de novo récurrente du gène *LMNA* impliquée dans 90% des formes typiques de HGPS. La mutation c.1824C>T (p.Gly608Gly) de l'exon 11 ne change pas la composition en acides aminés mais entraîne l'activation d'un site d'épissage donneur cryptique du transcrit *LMNA* conduisant à un épissage anormal du messager et à une délétion de 150 nucléotides. La protéine correspondante appelée progérine exerce un effet toxique sur les cellules (De Sandre-Giovannoli et al. 2003). Le site cryptique est régulé naturellement par le facteur SRSF-1. Chez le sujet humain âgé, des analyses ont montré la présence d'un taux de progérine élevé associé à des anomalies nucléaires (Scaffidi et Misteli 2006). La délétion en phase des 150 nucléotides entraîne la disparition de la séquence d'acides aminés contenant le site de clivage par l'enzyme métalloprotéase ZMPSTE24 (Gruenbaum et Foisner 2015). La progérine subit ainsi les mêmes trois premières étapes post traductionnelles que la prélamine A mais ne peut être clivée par ZMPSTE24 ce qui permet normalement d'achever la maturation de la prélamine A en lamine A soluble (renvoi à la partie II). Le site de clivage étant absent, la progérine conserve son groupement farnésyle et reste fixée à la membrane externe du réticulum endoplasmique. Elle s'accumule dans le noyau de la cellule où elle exerce un effet toxique (Cau et al. 2014) (**Figure 13**).

Figure 13 : Modifications post-traductionnelles de la progérine

La progérine subit les 3 premières étapes de modifications post-traductionnelles comme la prélamine A. La mutation progéria empêche le dernier clivage par l'enzyme ZMPSTE24 ce qui fait persister l'ancrage de la progérine à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire

**Cau & al., 2014*

La production de progérine joue un rôle dominant négatif et modifie l'équilibre dynamique des



différents types de lamine. Ainsi, la désorganisation de la lamina nucléaire entraîne la perte de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire responsable de nombreuses anomalies nucléaires (Claire L. Navarro, Cau, et Lévy 2006). Des études immunocytologiques sur différents types cellulaires révèlent des défauts de localisation de différentes protéines nucléaires et des anomalies morphologiques nucléaires comme des anomalies de taille, de forme et la formation de hernies caractéristiques sur l'enveloppe nucléaire. Ce phénotype cellulaire est associé à un turnover cellulaire accru qui augmente le nombre de mitoses et le taux d'apoptose (Ahmed et al. 2017). Hormis l'hypothèse mécanique, la présence de progérine entraîne également un défaut de régulation de l'expression génique et une altération des zones chromatinienne (López-Otín et al. 2013). Différentes études ont montré une augmentation des erreurs des marques épigéniques et un défaut de recrutement des protéines permettant les mécanismes de réparation de l'ADN. Les cellules présentent une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN reflétée par la phosphorylation de l'histone H2AX, la surexpression des gènes cibles de p53 et une diminution de la réplication cellulaire qui entraînent les cellules vers la voie apoptotique (Manju, Muralikrishna, et Parnaik 2006).

2. La dysplasie acro-mandibulaire due aux mutations du gène *LMNA*

La dysplasie acro-mandibulaire a été associée à des mutations du gène *LMNA* qui entraînent une forme multi-systémique plus modérée que la progéria, caractérisée par des altérations osseuses, une lipodystrophie et un vieillissement accéléré. Les premiers signes cliniques apparaissent entre l'âge de 2 et 5 ans alors que les signes de vieillissement accéléré se manifestent à partir de la deuxième décennie de vie. Cliniquement, les patients présentent des anomalies de la peau, des traits dysmorphiques de la face et des altérations osseuses caractérisées par une rigidité articulaire et une ostéolyse. L'anomalie du tissu adipeux se caractérise par une lipoatrophie des membres inférieurs, une hypertrophie du tissu adipeux au niveau du cou et du tronc. Ces anomalies sont accompagnées de désordres métaboliques dont un diabète de type 2 et une hypertriglycémie. De façon surprenante, il n'y a pas d'atteinte cardiaque ni musculaire dans la dysplasie acro-mandibulaire. Comme dans la progéria, les études montrent la présence de noyau anormaux, la perte de la chromatine périphérique, et un défaut de la lamina nucléaire (Vittoria Cenni et al. 2018).

3. Les laminopathies dues aux mutations du gène *ZMPSTE24*

Les laminopathies systémiques peuvent être également dues à des mutations du gène *ZMPSTE24*. Le gène *ZMPSTE24* code pour la métalloprotéase impliquée spécifiquement dans la dernière étape de maturation post-traductionnelle de la lamine A. La protéine *ZMPSTE24* est composée de 7 domaines transmembranaires et s'organise sous la forme d'un « tunnel » permettant de fixer et de cliver la pré-lamine A (Quigley et al. 2013). *ZMPSTE24* clive spécifiquement une séquence de 15 acides aminés en amont du site de farnésylation et libère la lamine A sous forme soluble (Cau et al. 2014).

Les mutations non-sens et faux-sens du gène *ZMPSTE24* entraînent un défaut d'activité totale ou partielle de l'enzyme et donc un défaut de production plus ou moins total de lamine A mature

(Claire Laure Navarro et al. 2014). La gravité de la pathologie est inversement corrélée à l'activité résiduelle de l'enzyme. Le spectre clinique montre des atteintes de degré variable allant de formes très sévères telles que la dermatopathie restrictive, à des formes plus modérées de syndrome progéroïde. Récemment, nos travaux ont montré que des mutations dans ce gène pouvaient conduire à des pathologies métaboliques moins sévères comme le syndrome métabolique (Galant et al. 2016).

La dermatopathie restrictive est une affection rare, de transmission autosomique récessive caractérisée par une atteinte cutanée et des mouvements réduits à la naissance. Les nouveau-nés meurent en période périnatale. Les mutations de type non-sens causales entraînent une absence totale de la protéase. Cette absence induit une accumulation de prélamine A, une mauvaise localisation des protéines nucléaires et un nombre important d'anomalies nucléaires (Claire L. Navarro et al. 2004).

La dysplasie acro-mandibulaire de type B est induite par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites du gène *ZMPSTE24* qui n'inactivent pas complètement l'enzyme. Les patients présentent un retard de croissance, des anomalies cranio-faciales et squelettiques et une lipodystrophie généralisée associée à des désordres métaboliques. Ce sont des formes plus sévères que la dysplasie acro-mandibulaire de type A qui présentent en outre une lipoatrophie généralisée, une micrognathie et une atteinte rénale (glomérulonéphrite) (Agarwal et al. 2003).

C. Les lipodystrophies

Dans cette partie, nous détaillerons les différents types de lipodystrophies. Plus précisément, nous décrirons les lipodystrophies d'origine génétique et les gènes impliqués dans ces pathologies. Finalement, nous décrirons la lipodystrophie familiale de type 2 ou syndrome de Dunnigan, dûe à des mutations du gène *LMNA* et les autres laminopathies dites métaboliques entraînant une anomalie du tissu adipeux.

1. Généralités

Les lipodystrophies constituent un groupe hétérogène de pathologies entraînant une absence complète ou une distribution anormale du tissu adipeux. Les lipodystrophies sont associées à de nombreux désordres métaboliques dont une insulino-résistance pouvant évoluer vers un diabète de type II et une hypertriglycéridémie sévère. Anatomiquement, les patients peuvent présenter une absence totale de tissu adipeux sous-cutané ou une absence de tissu adipeux limitée à certaines régions et associée à une hypertrophie du tissu adipeux dans d'autres régions. Les lipodystrophies peuvent être d'origine génétique ou acquises. Les formes génétiques sont des pathologies rares avec une prévalence difficilement estimée, située entre 1 cas sur 100 000 et 1 cas sur 1 million. Les formes acquises sont les plus fréquentes et sont imputables majoritairement à des causes iatrogènes, hormonales, métaboliques ou inflammatoires (M.-C. Vantyghem et al. 2012; Hussain et Garg 2016).

2. Les lipodystrophies acquises

Le syndrome de Cushing est dû à un hypercorticisme d'origine endogène ou exogène. Il constitue la forme la plus commune de lipodystrophie. Le traitement prolongé par corticoïde associé à une mauvaise observance entraîne une hypercortisolémie responsable du syndrome de Cushing (Chaudhry et Bhimji 2017).

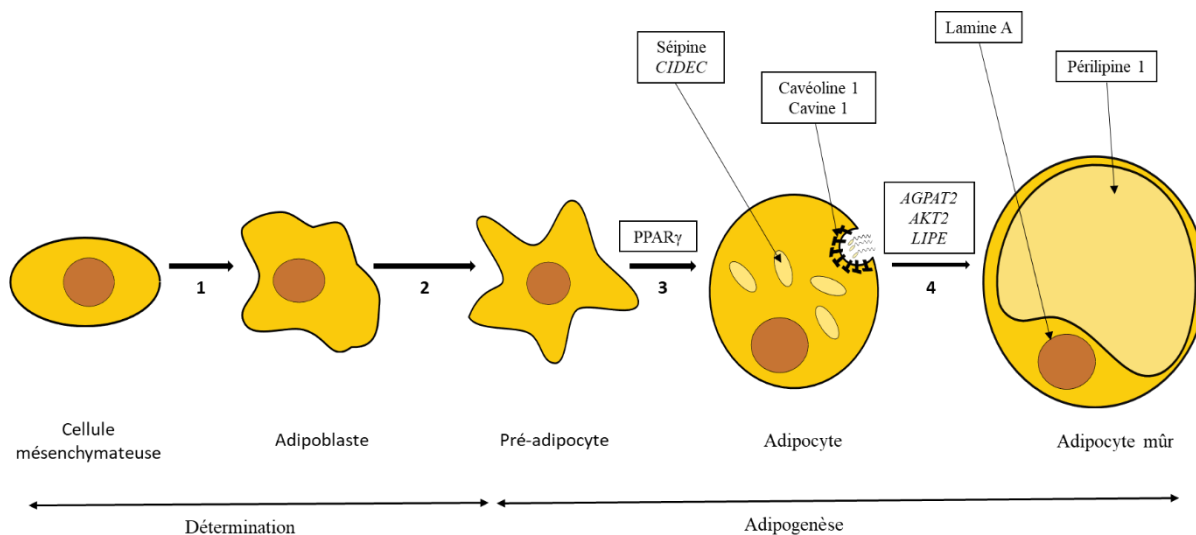
Parmi les formes iatrogènes, il est intéressant de mentionner la lipodystrophie induite par les traitements antirétroviraux. La lipodystrophie apparaît après 2 à 4 ans de traitement par certains inhibiteurs de protéase et certains analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (Guzman et Al Aboud 2018). Les patients présentent une perte du tissu adipeux au niveau des membres inférieurs et de la face et une accumulation au niveau du tronc et de l'abdomen et de nombreux troubles métaboliques. De nombreuses études ont démontré l'effet inhibiteur des antiprotéases sur l'enzyme ZMPSTE24 indispensable à la maturation de la prélamine A (Coffinier et al. 2007) qui entraîne donc une accumulation de prélamine A. Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse peuvent également induire une lipodystrophie et des troubles métaboliques en causant une atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale (M.-C. Vantyghem et al. 2012). L'utilisation de nouveaux antiprotéasiques ne présentant pas d'action sur ZMPSTE24 ont permis de limiter cet effet secondaire.

3. Les lipodystrophies d'origine génétique

Les syndromes lipodystrophiques d'origine génétique se caractérisent par une insulino-résistance, une dyslipidémie pouvant être associée à une stéatose hépatique et une absence partielle ou totale de tissu adipeux. Ce tryptique se manifeste de façon plus ou moins sévère en fonction du gène causal, de la mutation impliquée, de la quantité de tissu adipeux actif et du sexe du patient. Une étude approfondie par des examens cliniques, l'analyse de la masse grasseuse et des études de biologie moléculaire permettent de confirmer le diagnostic de lipodystrophie d'origine génétique.

Depuis une dizaine d'années, une dizaine de gènes a été associée à des syndromes lipodystrophiques partiels ou généralisés qui ont permis d'établir l'importance de nombreuses voies moléculaires et de comprendre leurs impacts sur le tissu adipeux (A. Garg 2000) (**Figure 14**).

Enfin, les femmes ont une masse grasse globalement plus importante que les hommes et sont plus nombreuses à développer un syndrome lipodystrophique. Elles présentent des désordres métaboliques plus sévères que les hommes et un aspect morphologique androïde au niveau du tronc, de la face et des membres inférieurs facilitant le diagnostic clinique (Hussain et Garg 2016).



a. Les lipodystrophies congénitales généralisées

Figure 14 : Facteurs intervenant dans la maturation du tissu adipeux et responsables des lipodystrophies monogéniques

Les lipodystrophies congénitales généralisées (CGL) ou syndrome de Berardinelli-Seip se définissent par une absence complète du tissu adipeux sous-cutané. La prévalence est estimée à 1 cas sur 10 millions. Les patients présentent en outre des troubles métaboliques importants dès les premières années de vie, dont une insulino-résistance puis un diabète de type II, une hypertriglycéridémie, une augmentation du métabolisme basal, un acanthosis nigricans. Les complications se présentent sous forme de pancréatites. Les signes cliniques et biologiques témoignent de l'incapacité des adipocytes à remplir leur rôle de stockage et de libération d'énergie sous forme de triglycérides. La sécrétion endocrine du tissu adipeux est empêchée et entraîne un déséquilibre métabolique induisant de nombreux désordres (M.-C. Vantyghem et al. 2012). Les mutations impliquées dans cette pathologie entraînent des phénotypes de sévérité variable. A ce jour, des mutations sur 4 gènes ont été associées à cette pathologie impliquant des mécanismes cellulaires différents. Les mutations entraînent une perte de fonction et sont transmises généralement selon un mode autosomique récessif. Deux des 4 gènes sont responsables de la formation des cavéoles qui permettent l'internalisation et le stockage des triglycérides : *PTRF* et *CAVI* (Jeninga et Kalkhoven 2010). Les 2 autres, *BSCL2* et *AGPAT2*

jouent respectivement un rôle dans la formation des gouttelettes lipidiques et dans les voies biochimiques permettant le stockage des acides gras libres en triglycérides (Hussain et Garg 2016) (**Figure 14**).

b. Les lipodystrophies partielles familiales

Les lipodystrophies familiales partielles (FPLD) sont caractérisées par une lipoatrophie des membres inférieurs associée à une hypertrophie du tissu adipeux du tronc et du cou. La prévalence est de 1 cas pour 100,000. Les signes cliniques et biologiques apparaissent entre l'adolescence et l'âge de 30 ans. Les patients développent une insulino-résistance pouvant évoluer en diabète de type II et une hypertriglycémie (Hussain et Garg 2016). Les femmes sont plus sévèrement atteintes que les hommes et sont souvent mieux diagnostiquées du fait de l'aspect androïde de la répartition des graisses. De nombreux gènes ont été mis en évidence depuis les deux dernières décennies et ont permis d'impliquer de nombreuses voies biochimiques intervenant dans l'homéostasie du tissu adipeux. Les gènes impliqués dans les lipodystrophies interviennent dans différentes fonctions du tissu adipeux : développement et sénescence, voies biochimiques et structure des gouttelettes lipidiques (Jeninga et Kalkhoven 2010) (**Tableau 1**).

Le syndrome de Dunnigan ou lipodystrophie familiale partielle de type 2 est causé par des mutations du gène *LMNA*. Il constitue la plus fréquente des FPLD. Il fera l'objet d'une description approfondie dans cette thèse, et ne sera donc que rapidement abordé dans cette partie.

Nom de la pathologie	Nom du gène	Mode de transmission	Aspect clinique	Anomalies biologiques	Nombre de cas recensés	Atteinte musculaire	Atteinte cardiaque	Autres atteintes
Lipodystrophie partielle familiale de type 1 ou syndrome de Köberling	Inconnu	AD	Lipoatrophie des membres inférieurs, obésité androïde, acanthosis nigricans, hirsutisme	Diabète de type 2, dyslipidémie, hypertriglycéridémie, stéatose hépatique	Inconnu	Amyotrophie	Complications cardiovasculaires	Syndrome des ovaires polykystiques
Lipodystrophie partielle familiale de type 2 ou Syndrome de Dunnigan	LMNA	AD	Lipoatrophie des membres inférieurs, hypertrophie partielle du tissu adipeux au niveau de la face et du tronc, acanthosis nigricans	Diabète de type 2, dyslipidémie, stéatose hépatique, hypertension artérielle	Sous-type le plus commun. Plus de 500 patients recensés dans le monde	Hypertrophie musculaire rapportée pour certaines mutations	NR	Syndrome des ovaires polykystiques
Lipodystrophie partielle familiale de type 3	PPAR γ	AD	Lipoatrophie des membres inférieurs, anomalie de répartition du tissu adipeux au niveau de la face et du tronc, acanthosis nigricans, hirsutisme, stéatose hépatique	Diabète de type 2, dyslipidémie, hypertension artérielle	30 à 50 patients reportés. Sous-type le plus commun après le syndrome de Dunnigan	Légère amyotrophie	NR	NR
Lipodystrophie partielle familiale de type 4	PLIN1	AD	Lipoatrophie des membres inférieurs, acanthosis nigricans, apparence cushingoïde	Diabète de type 2, hypertension artérielle, hypertriglycéridémie sévère	Rapporté dans 3 familles	Hypertrophie musculaire des mollets	Infarctus rapporté à l'âge de 30-40 ans	NR
Lipodystrophie partielle familiale de type 5	CIDEA	AR	Lipoatrophie partielle des membres inférieurs, acanthosis nigricans	Insulinorésistance et diabète de type 2	1 patient décrit	NR	NR	NR
Lipodystrophie partielle familiale de type 6	LIPE	AR	Redistribution de la masse graisseuse	Diabète de type 2, stéatose hépatique, dyslipidémie caractérisée par une hypertriglycéridémie sévère	6 patients décrits	Amyotrophie dans une famille consanguine italienne	NR	NR
Lipodystrophie d'origine génétique associée au gène AKT2	AKT2	AD	Diminution de 35% de la masse graisseuse par rapport à un individu de même taille.	Diabète de type 2, stéatose hépatique, dyslipidémie caractérisée par une hypertriglycéridémie sévère.	1 famille recensée	NR	NR	NR

Tableau 1 : Description des différents types de lipodystrophie génétique familiale

- AD : Autosomique dominant
- AR : Autosomique récessif
- NR : Non renseigné

c. Les gènes impliqués dans les lipodystrophies

i. Anomalie du développement du tissu adipeux

▪ $PPAR\gamma$

Les mutations du gène *PPAR γ* entraînent la lipodystrophie partielle familiale d'origine génétique la plus fréquente après le syndrome de Dunnigan. Le mode de transmission est autosomique dominant. Le gène *PPAR γ* situé sur le chromosome 3 code pour la protéine $PPAR\gamma$ qui appartient à la sous-famille des récepteurs nucléaires PPAR. $PPAR\gamma$ est un facteur de transcription impliqué dans de très nombreux mécanismes, il est notamment exprimé majoritairement dans les adipocytes (Campeau et al. 2012). Le rôle prépondérant de $PPAR\gamma$ a été mis en évidence dans la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes mûrs et également dans le maintien des fonctions des adipocytes (Tang et Lane 2012). Les patients ont un phénotype proche mais moins sévère que les patients atteints d'un syndrome de Dunnigan. Une hypertension artérielle, une hypertriglycéridémie sévère, et une augmentation inexplicée des enzymes musculaires accompagnent les signes cliniques (Astapova et Leff 2014).

ii. Protéines des voies métaboliques

▪ AKT2

La protéine AKT2 codée par le gène du même nom est majoritairement exprimée dans les adipocytes. AKT2 ou protéine kinase B est une enzyme clé dans la voie de signalisation de l'insuline. Elle permet la régulation des récepteurs à l'insuline via son cofacteur PI3PK. De très rares cas de lipodystrophies partielles familiales ont été associés au gène *AKT2*. Les patients ont un phénotype similaire au syndrome de Dunnigan, associé à une insulino-résistance sévère (George et al. 2004).

▪ LIPE

La lipase hormonosensible a été associée à une lipodystrophie partielle familiale. Codée par le gène *LIPE* situé sur le chromosome 19, elle est exprimée principalement dans le tissu adipeux,

le tissu musculaire, cardiaque, ovarien et testiculaire. La lipase hormonosensible est un médiateur crucial dans l'hydrolyse des glycérides et du cholestérol dans le tissu adipeux à l'âge adulte. Le défaut d'activité enzymatique de la lipase hormonosensible est associé à une lipoatrophie des membres inférieurs et une myopathie. Les patients présentent des troubles métaboliques tels qu'un diabète de type II, une hypertriglycéridémie et une stéatose hépatique (Farhan et al. 2014).

iii. Anomalies de structure des gouttelettes lipidiques

▪ *PLIN1*

Le gène *PLIN1* a été impliqué dans des cas de lipodystrophies partielles familiales de transmission dominante. Le gène *PLIN1* code pour la périlipine 1, qui est exprimée exclusivement à la surface des gouttelettes lipidiques des adipocytes (Kozusko et al. 2015), où elle joue un rôle majeur dans leur formation et dans le mécanisme permettant le stockage et la libération des triglycérides (Brasaemle et al. 2009). Les patients développent un diabète de type II, une hypertension artérielle et des anomalies de la conduction cardiaque. Cliniquement, ils présentent une lipoatrophie des membres inférieurs associée à une pseudohypertrophie musculaire et un syndrome cushingoïde. Les mutations décrites entraînent l'apparition d'un codon stop prématuré et l'expression d'une protéine tronquée (Gandotra et al 2011).

▪ *CIDEA*

Le gène *CIDEA* (cell death-inducing DFFA-like effector C) a été également associé à une lipodystrophie partielle familiale. Il code pour la protéine du même nom qui est localisée sur la membrane des gouttelettes lipidiques. *CIDEA* joue un rôle dans leur formation et colocalise avec la périlipine 1. Chez les patients, les adipocytes comportent plusieurs gouttelettes lipidiques ce qui entraîne un défaut de stockage et de libération des acides gras. Les patients

présentent une lipoatrophie partielle des membres inférieurs, un acanthosis nigricans associé à des troubles métaboliques tels qu'un diabète de type II, une hypertriglycémie et une hypertension artérielle sans anomalie cardiaque ni musculaire (Rubio-Cabezas et al. 2009).

iv. Anomalie de la sénescence du tissu adipeux

▪ LMNA

Le gène *LMNA* est responsable de la plus fréquente des lipodystrophies d'origine génétique : la lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan. La transmission est autosomique dominante et la pénétrance est quasiment complète. L'accumulation de lamine A mutée entraîne un défaut des adipocytes en augmentant leur sénescence et en impactant leur rôle de stockage et de libération des triglycérides (M.-C. Vantyghem et al. 2012).

D. Le syndrome de Dunnigan

1. Histoire de la maladie

Le syndrome de Dunnigan ou lipodystrophie partielle familiale de type 2 a été décrit pour la première fois en 1974 (Dunnigan et al. 1974). Les premiers patients issus d'une famille écossaise présentaient un diabète de type II, des anomalies du bilan lipidique associées à une lipoatrophie des membres inférieurs et une hypertrophie du tissu adipeux au niveau de la nuque et du cou. Les progrès des analyses de biologie moléculaire à la fin des années 1990 et au début des années 2000 ont permis d'identifier pour la première fois des mutations causales dans le gène *LMNA* (R. A. Hegele 2000; Vigouroux et al. 2000a; Speckman et al. 2000). Depuis, de nombreuses mutations ont été décrites, confirmant une transmission autosomique dominante. La prévalence du syndrome de Dunnigan est difficile à déterminer, mais peut être estimée à 1 cas sur 200,000.

2. Clinique

Les patients atteints du syndrome de Dunnigan ne présentent aucun signe clinique dans l'enfance. Les premières manifestations sont observées à partir de l'adolescence. Les patients développent une insulino-résistance et des anomalies du bilan lipidique caractérisées par une hypertriglycémie. On observe une lipoatrophie des membres inférieurs accompagnée d'une hypertrophie du tissu adipeux au niveau de la face et du cou, un acanthosis nigricans, une hyperphagie, un hirsutisme et des anomalies de la reproduction chez les femmes (syndrome des ovaires polykystiques, fausse-couche, infertilité) (M. C. Vantyghem et al. 2008). Les patients développent au fil des années une hypertension artérielle, un diabète de type II et une aggravation de l'hypertriglycémie (Abhimanyu Garg 2004) plus rarement des anomalies musculaires. L'aspect athlétique des membres inférieurs résulte de l'absence de tissu adipeux

(A. Garg 2000). Les femmes sont plus gravement atteintes que les hommes et développent des anomalies du bilan lipidique, une insulino-résistance et des anomalies cardiaques plus sévères (Hussain et Garg 2016).

Ces caractéristiques s'accompagnent de complications diverses comme une infertilité, des fausses couches et dans plus de 50% des cas une polykystose ovarienne (M. C. Vantyghem et al. 2008) ou encore une stéatose hépatique ou une pancréatite dues à l'accumulation de triglycérides dans le sang (Abhimanyu Garg 2004). Les anomalies métaboliques peuvent également induire des complications cardio-vasculaires pouvant entraîner un décès prématuré.

3. Caractéristiques cellulaires

Des études cytologiques ont montré que les cellules des patients atteints du syndrome de Dunnigan présentent des signes similaires à ceux observés sur les cellules de patients Progeria (Worman et Bonne 2007). En effet, sur les fibroblastes, on note une perte de l'intégrité de la structure de l'enveloppe nucléaire (Vigouroux et al. 2001) avec un taux élevé d'anomalies nucléaires caractérisées par la présence de hernies de matériel génétique dans le cytoplasme (Broers et al. 2006). Elles présentent également une accumulation de prélamine A dans le noyau, ainsi qu'une dérégulation de la transcription de facteurs impliqués dans l'adipogenèse. Récemment, des expériences ont montré le rôle de la lamine A dans la répression du locus MEST/miR-335 permettant d'assurer l'expression des gènes pro-adipogènes. Ce locus n'est pas réprimé dans les adipocytes porteurs de la mutation p.Arg482Trp, ce qui permet l'expression du miR-335 et l'inhibition de l'expression des gènes pro-adipogènes (Oldenburg et al. 2017; Elzeneini et Wickström 2017).

4. Spectre mutationnel

Depuis le début des années 2000, de nombreuses mutations du gène *LMNA* ont été impliquées dans le syndrome de Dunnigan. Un hot-spot mutationnel a été décrit dans l'exon 8 sur le codon 482. Ce codon correspond à un acide aminé situé dans le domaine globulaire C-terminal de la protéine et est responsable de 85% des cas de syndrome de Dunnigan (Broers et al. 2006). Les autres mutations associées au syndrome de Dunnigan répertoriées par le site HGMD se situent majoritairement dans le domaine de liaison aux immunoglobulines et le domaine C-terminal. Il existe 13 mutations associées au syndrome de Dunnigan dont 6 dans l'exon 8. D'autres mutations dans le gène *LMNA* sont impliquées dans des phénotypes proches du syndrome de Dunnigan classées comme des laminopathies métaboliques. D'autres mutations sont associées à un phénotype chevauchant 2 formes de laminopathies avec par exemple une atteinte du tissu musculaire et/ou du tissu nerveux périphérique ce qui révèle la complexité de la relation génotype-phénotype dans ces pathologies (van Tintelen et al. 2007; Muschke et al. 2007).

5. Traitement

Le traitement des patients atteints de syndrome de Dunnigan repose sur la prise en charge des anomalies métaboliques. Dans un premier temps, des mesures hygiéno-diététiques sont combinées avec un traitement anti-diabétique à base de Metformine ou Insuline, un traitement antihypertenseur et un traitement anticholestérolémiant (de statines et d'oméga-3). Les problèmes de fertilité sont traités par un traitement hormonal de substitution. L'accès à la chirurgie réparatrice peut éventuellement corriger les signes disgracieux induits par la maladie, notamment par liposuction des excès de tissu graisseux. Les patients présentant un faible taux de leptine dans le sang peuvent recevoir un traitement par substitution d'un analogue de la leptine : la metreleptine. Ce traitement améliore le taux d'insuline et des triglycérides dans le

Les laminopathies

sang et agit sur l'état global du patient. Il doit être ajusté au cours du temps pour diminuer les risques de problème cardio-vasculaire (Paz-Filho, Mastronardi, et Licinio 2015).

V. Le syndrome métabolique : une forme atténuée de laminopathie spécifique du tissu adipeux ?

1. Historique

Depuis les premières descriptions il y a près d'un siècle, la définition du syndrome métabolique a évolué. Dès les années 1930, Eskil Kylin et Gregorio Marañon avaient mis en évidence un lien entre le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle et avaient suggéré l'existence de mécanismes communs (Nilsson 2001). En 1956, Jean Vague fut le premier à différencier cliniquement l'obésité androïde et l'obésité gynoïde et à mettre en évidence une association entre athérosclérose, diabète de type 2, obésité androïde, goutte et calculs rénaux (Vague 1999). En 1988, Reaven met en lumière l'importance de l'insulino-résistance comme contributeur au développement du diabète de type 2 menant à l'apparition de maladies cardiovasculaires. Il associe plusieurs facteurs biologiques dont le taux élevé de VLDL, le faible taux d'HDL, l'hypertension artérielle et l'hyperinsulinémie (Reaven 1988). Il suggère un rôle négatif des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. Pour unifier ces différents facteurs, il définit leur association sous le nom de syndrome X. Au fil des années 90, sur la base du syndrome X, les chercheurs ont mis en avant l'importance de la quantité de graisse sous-cutanée et l'obésité centrale comme base de la définition du syndrome métabolique (Haffner et al. 1992). D'autres travaux ont mis en lumière le rôle majeur de l'insulino-résistance dans le développement de l'entité syndrome X. Au-delà des nombreuses définitions proposées par les équipes de recherche dans le monde, l'OMS propose une première définition en 1998 afin d'unifier la communauté scientifique devant le problème de santé publique généré par l'augmentation de l'obésité et du diabète de type 2 dans les pays développés (K. G. Alberti et

Zimmet 1998). Actuellement, le concept de syndrome métabolique est abandonné au profit d'autres dénominations comme le syndrome cardio-métabolique.

2. Définition

A ce jour, plusieurs définitions coexistent pour le syndrome métabolique avec des critères cliniques et biologiques qui diffèrent selon les définitions. Une première définition a été établie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 1998 mettant en avant l'association du diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (K. G. Alberti et Zimmet 1998). L'insulino-résistance est considérée comme le critère majeur. Celle-ci étant difficile à évaluer, elle est associée à deux autres critères parmi les suivants pour établir le diagnostic : une obésité androïde caractérisée par un IMC $>30\text{kg/m}^2$ et un ratio hanche/taille >0.9 pour les hommes et >0.85 pour les femmes, une hypertension artérielle ($>140/90$ mm d'Hg) et une dyslipidémie caractérisée par un taux de HDL-cholestérol $< 1\text{mmol/L}$ et un taux de triglycérides $> 1.7\text{mmol/L}$. Une autre définition a été proposée en 2001 par le groupe américain NCEP-ATPIII (National Education Cholesterol Program – Adult Treatment Panel III) qui se veut plus facile et plus pratique que la définition de l'OMS de 1998 (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults 2001).

En 2005, l'IDF (International Diabetes Foundation) donne une définition du syndrome métabolique basée sur les mêmes critères que l'OMS et NCEP-ATPIII mais place l'obésité centrale et l'insulino-résistance comme principaux facteurs. Trois critères ou plus parmi 5 sont nécessaires pour poser le diagnostic. Cette définition prend en compte les différents groupes ethniques et permet ainsi d'affiner le diagnostic et de prévenir la survenue des maladies cardiovasculaires (K. G. M. M. Alberti, Zimmet, et Shaw 2006).

Chez les jeunes adultes et les enfants, les critères ont été adaptés. La définition harmonisée par l'IDF en 2007 permet de définir les critères d'obésité et d'affiner les critères pour les hommes et les femmes (Kaur 2014) (**Tableau 2**).

	OMS 1999	EGIR 1999	NCEP/ATPIII	IDF
Obésité	Obésité centrale : • IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ • Ratio taille/hanche > 0.9 pour les hommes et > 0.8 pour les femmes	Obésité abdominale : • Circonférence de la taille $\geq 94 \text{ cm}$ chez les hommes et $\geq 80 \text{ cm}$ chez les hommes	Obésité abdominale : • Circonférence de la taille $\geq 102 \text{ cm}$ chez l'homme et $\geq 88 \text{ cm}$ chez les femmes	Obésité centrale • Circonférence de la taille dépendant de l'origine ethnique chez les hommes et les femmes
Hypertension artérielle	$\geq 140/90 \text{ mm de Hg}$	• $\geq 140/90 \text{ mm de Hg}$ • Traitement antihypertenseur	$\geq 140/85 \text{ mm de Hg}$	$\geq 130 \text{ mm de Hg}$ systolique $\geq 85 \text{ mm de Hg}$ diastolique
Dyslipidémie	Hypertriglycéridémie $\geq 150 \text{ mg/dl}$ ou hypoHDLémie $\leq 35 \text{ mg/dl}$ pour les hommes et $\leq 39 \text{ mg/dl}$ pour les femmes	Hypertriglycéridémie $\geq 150 \text{ mg/dl}$ ou hypoHDLémie $\leq 39 \text{ mg/dl}$	Hypertriglycéridémie $\geq 150 \text{ mg/dl}$ ou hypoHDLémie $< 40 \text{ mg/dl}$ chez les hommes et $< 50 \text{ mg/dl}$ chez les femmes	Hypertriglycéridémie $\geq 150 \text{ mg/dl}$ ou hypoHDLémie $< 40 \text{ mg/dl}$ chez les hommes et $< 50 \text{ mg/dl}$ chez les femmes
Insulinorésistance	Hyperglycémie à jeun ou diabète de type 2	Syndrome d'insulinorésistance	Hyperglycémie à jeun $> 110 \text{ mg/dl}$	Hyperglycémie à jeun $\geq 100 \text{ mg/dl}$ ou diabète de type 2
Autres critères	Microalbuminurie $20 \mu\text{g/min}$ ou albumine/créatinine $\geq 30 \mu\text{g/mg}$	RAS	RAS	RAS
Diagnostic	Hyperglycémie et 2 autres critères ou plus	Hyperglycémie et 2 autres critères ou plus	3 critères ou plus	Obésité centrale plus 2 critères

Tableau 2 : Comparaison des différentes définitions du syndrome métabolique

RAS : Rien à signaler

3. Epidémiologie

La prévalence du syndrome métabolique est estimée entre 20 et 25% de la population selon l'IDF (K. G. M. M. Alberti, Zimmet, et Shaw 2006). Néanmoins, ce chiffre n'est pas reproductible d'un continent à l'autre du fait des nombreux facteurs influant sur l'apparition du syndrome métabolique, comme l'âge, l'ethnicité, l'alimentation, le genre ou le statut social. (Ford, Giles, et Dietz 2002). Pour les caucasiens et les afro-américains la prévalence varie respectivement entre 22 et 25% alors que pour les populations hispaniques elle atteint 33% (Watkins 2004). La prévalence dans la population européenne est estimée à 20%. Le syndrome métabolique est un enjeu majeur de santé publique. Il augmente le risque de diabète de type 2, de maladies cardiovasculaires. Il est également associé à d'autres comorbidités dont la stéatose hépatique, un état pro-thrombotique et pro-inflammatoire et des troubles de la reproduction. Certains articles ont également rapporté une association entre le syndrome métabolique et l'apparition de certains types de cancer (Esposito, Capuano, et Giugliano 2014).

4. Physiopathologie

A ce jour, le syndrome métabolique s'explique par de nombreux facteurs. La surconsommation de nourriture de faible qualité, riche en calories et l'absence d'activité physique quotidienne expliquent l'augmentation des cas d'obésité et des cas de syndrome métabolique. Cette surconsommation de nourriture associée avec des facteurs génétiques et/ou des facteurs interindividuels conduit à une hypertrophie du tissu adipeux. L'énergie est stockée sous forme de triglycérides dans les adipocytes blancs qui sont alors hypertrophiques et hyperplasiques. L'élargissement des adipocytes blancs entraîne une hypoxie localisée induisant l'infiltration des macrophages et des métabolites actifs dont des cytokines pro-inflammatoires, des adipokines et des acides gras libres (Cinti et al. 2005; Halberg, Wernstedt-Asterholm, et Scherer

2008). Le tissu adipeux blanc sain est métaboliquement actif et sécrète de nombreuses molécules permettant l'équilibre entre les périodes de stockage de l'énergie sous forme de triglycérides et la libération d'énergie sous forme d'acide gras libres (McGown, Binerdinc, et Younossi 2014). L'activité du tissu adipeux est altérée ce qui entraîne une dérégulation globale. En effet, de nombreux médiateurs pro-inflammatoires sont sécrétés dont TNF α , CRP, IL6 et PAI1 (Lau et al. 2005). Le TNF α promeut la libération d'acides gras libres et l'insulino-résistance par l'inhibition de IRS1. Il est également associé à l'obésité et à l'hypertriglycéridémie (Tzanavari, Giannogonas, et Karalis 2010). Il provoque plus globalement l'inhibition de la lipoprotéine lipase, la sensibilité à l'insuline et la production de CRP dont le taux élevé est associé avec l'apparition de maladies cardiovasculaires (Todendi et al. 2015; Pradhan et al. 2001). PAI1 est sécrété par les plaquettes et le tissu adipeux. Un taux élevé de PAI1 est associé avec l'obésité et les maladies cardiovasculaires (Bilgic Gazioglu et al. 2015).

En parallèle, deux facteurs se révèlent être altérés. L'adiponectine sécrétée par le tissu adipeux permet de réguler de nombreuses voies métaboliques dont le métabolisme du glucose et des lipides, la sensibilité à l'insuline ainsi que l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires. Elle est fortement diminuée dans le syndrome métabolique ce qui favorise un état d'inflammation chronique et les désordres retrouvés dans le syndrome métabolique (Nigro et al. 2014). La leptine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux et agissant sur l'hypothalamus. Son action centrale induit la sécrétion de peptides anorexigènes permettant la sensation de satiété (Rosenbaum et Leibel 2014). Dans les cas d'obésité ou de syndrome métabolique, la leptine est très augmentée mais son rôle est inefficace suite au développement d'une résistance à la leptine (Crujeiras et al. 2015).

Dans une autre mesure, les patients présentent une insulino-résistance provoquée par une incapacité des tissus musculaire, adipeux et hépatique à gérer l'hyperglycémie. Les cellules β du pancréas sécrète l'insuline pour pallier l'excès de glucose dans le sang ce qui entraîne une désensibilisation des différents récepteurs à l'insuline (Alam et al. 2014). Le développement du diabète de type 2 survient quand l'efficacité physiologique de l'insuline n'est plus suffisante entraînant une hyperglycémie chronique qui conduit principalement à des manifestations cliniques cardiaques, rénales et endothéliales (Halcox et Misra 2015).

On peut constater une augmentation des triglycérides, des LDLs et une diminution des HDLs traduisant une altération du métabolisme lipidique. L'insulino-résistance et les anomalies du bilan lipidique mènent à une altération des cellules endothéliales et une augmentation du risque de formation de plaque d'athérome (Casavalle et al. 2014). Les vaisseaux sanguins dilatés perdent en compliance ce qui, combiné à l'insulino-résistance et la dyslipidémie, favorise l'athérosclérose (Vykoukal et Davies 2011). D'autres facteurs s'ajoutent comme la production de ROS et la diminution de NO nécessaire à l'homéostasie des cellules endothéliales (Toda et Okamura 2013).

5. Facteurs génétiques

A ce jour, les études à grande échelle sur la mise en évidence de déterminants génétiques du syndrome métabolique s'avèrent une tâche difficile. Etant une maladie basée sur des composantes cliniques et biologiques distinctes, la part de l'héritabilité se base sur une génétique multifactorielle associée à l'effet de l'environnement. Chaque critère de la maladie pris séparément, peut avoir des causes monogéniques ou multifactorielles. L'héritabilité a été estimée à 24% dans une étude comprenant 803 sujets issus de 89 familles hispano-caribéennes (Lin et al. 2005).

Les études de liaison ou par association de gènes candidats et GWAS (Genome Wide Association Studies) ont nécessité le recrutement de grandes cohortes pour étudier les déterminants génétiques du syndrome métabolique. Les différentes analyses de liaison ont permis d'identifier de nombreux loci associés au syndrome métabolique ou ses composantes. Néanmoins, il est difficile de discriminer efficacement des loci caractéristiques de la pathologie ou de la cohorte étudiée.

Les GWAS se sont basées sur l'étude de SNPs dans des gènes reliés à la physiopathologie du syndrome métabolique dont le métabolisme lipidique, le métabolisme glucidique, le stockage d'énergie sous forme de graisses, la machinerie cellulaire et les gènes responsables du vieillissement de la cellule. Ces études ont été effectuées en associant les SNPs soit avec un trait du syndrome métabolique, soit deux traits ; permettant de mettre en évidence dans les cohortes l'importance de SNPs dans certains mécanismes biologiques. Ainsi, les différentes cohortes établies dans les différentes régions du globe ont reporté de nombreux loci associés aux composantes du syndrome métabolique. La plupart des loci sont associés à des gènes ayant un rôle dans le métabolisme lipidique et peuvent avoir un effet pléiotropique. Les gènes *IRS*, *FTO* et *MC4R* montrent l'importance du tissu adipeux et de la sensibilité à l'insuline dans la

maladie (Stančáková et Laakso 2014). De plus, une méta-analyse reposant sur 18 études a révélé une association positive entre le syndrome métabolique et des polymorphismes du gène *FTO* (H. Wang et al. 2012).

Des études ont également été réalisées sur les microRNAs et sur les marques épigénétiques associées au syndrome métabolique. Par exemple, la surexpression des MiR-33a et MiR-33b favorise la diminution de HDL cholestérol, la diminution de la β -oxydation des acides gras et la diminution de la sensibilité à l'insuline contribuant à l'apparition des critères du syndrome métabolique (Gharipour et Sadeghi 2013; Musso, Gambino, et Cassader 2010). Certaines marques épigénétiques dans les gènes « clock » (*BMAL1*, *CLOCK* et *PER2*) sont apparues hypométhylées dans le syndrome métabolique (Hosoki et al. 2008).

La lipodystrophie partielle familiale est une maladie monogénique principalement due à des mutations des gènes *LMNA* et *PPAR γ* (Elzeneini et Wickström 2017). Ce phénotype présente des similarités avec celui du syndrome métabolique suggérant la possibilité de mécanismes communs. En effet, des articles ont mis en évidence une association entre syndrome métabolique et des mutations dans *LMNA* et *PPAR γ* qui confirment les similitudes entre SM et lipodystrophies partielles familiales (Astapova et Leff 2014; Vigouroux et al. 2000a).

Ces différentes approches révèlent la difficulté de mettre en avant une cause génétique unique. Il est nécessaire d'intégrer à ces résultats différentes variables dont l'origine géographique, ainsi que différentes causes environnementales comme les conditions sociales et les habitudes alimentaires.

Partie 2 : Travail expérimental

Ce travail repose sur l'étude de 11 patients présentant un syndrome métabolique associé à un taux d'anomalies nucléaires élevé. Ces patients présentent une obésité androïde modérée, associée à des désordres métaboliques dont une insulino-résistance et des anomalies du bilan lipidique. En culture, les cellules de ces patients présentent toutes des anomalies nucléaires de forme et de répartition de la lamine A, anomalies typiquement retrouvées dans les laminopathies.

Parmi ces 11 patients, 3 sont porteurs de mutations hétérozygotes faux-sens du gène *LMNA*, un est porteur d'une mutation hétérozygote faux-sens du gène *ZMPSTE24* et 7 ne sont porteurs d'aucune mutation ni dans ces 2 gènes ni dans aucun des gènes codant pour les protéines impliquées dans la maturation de la prélamine A ou dans les lipodystrophies génétiques.

Le travail expérimental présenté ici consiste à apporter des arguments fonctionnels permettant d'impliquer les mutations des gènes *LMNA* et *ZMPSTE24* dans la survenue du syndrome métabolique. Des tests permettant de déterminer in vitro la capacité des cellules de patients à proliférer, leur niveau de sénescence et l'intégrité de l'enveloppe nucléaire ainsi que des transfections transitoires de cellules témoins ont été utilisés pour établir un lien entre les mutations caractérisées et les anomalies nucléaires observées.

Matériels et Méthodes

I. Techniques de biologie moléculaire et cellulaire

A. Lignées cellulaires contrôle et patients

Les patients sont issus de la cohorte constituée par le service d'endocrinologie de l'hôpital Nord de Marseille dirigé par le professeur Anne Dutour (Dutour et al. 2011). Les cellules utilisées *in vitro* sont des fibroblastes. Les fibroblastes témoins proviennent de l'institut Coriell et sont décrits dans le **tableau 3**. Les cultures primaires de patients sont conservées au CRB TAC Timone.

Nom de la lignée contrôle	Source	Ethnie	Genre	Âge
AG7095 (Contrôle 1)	Coriell	Afro-américain	Masculin	3 ans
AG09309 (Contrôle 2)	Coriell	Caucasien	Féminin	21 ans
13334 (Contrôle 3)	Autres	Caucasien	Féminin	42 ans

Tableau 3 : Données sur les lignées témoins de fibroblastes

B. Culture cellulaire de lignées primaires de fibroblastes humains

Les fibroblastes sont cultivés dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biowest, USA) avec 1g/L de glucose supplémenté (Biowest, France) avec 15% de sérum de veau fœtal (Eurobio, France), 1% de L-glutamine à 200mM (Thermo Scientific, Ecosse) et 1% d'un cocktail combinant des antibiotiques (10 000 unités/mL de pénicilline, 10 000µg/mL de streptomycine) et des antifongiques (25µg/mL d'amphotéricine B)

(Pénicilline/Streptomycine/Amphotéricine B) (Gibco™, USA). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide sous 5% de CO₂.

Les passages des cellules sont effectués entre 2 et 4 jours selon le taux de confluence observé dans la flasque. Le milieu de culture est aspiré et les fibroblastes sont lavés avec du DPBS 1X (Gibco™, France) qui est lui-même ensuite éliminé. Les cellules sont ensuite décollées par 2mL de trypsine/EDTA 1X incubées pendant 5 minutes dans une étuve à 37°C en atmosphère humide à 5% CO₂. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 8mL de milieu de culture et les cellules sont centrifugées à 1100 tours par minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans du milieu de culture et transféré dans des plaques T25 ou T75 cm² (SPL Life Science, Corée du sud), des Labtek (Alkali Scientific, Espagne), des plaques 6 puits (vWR, USA) ou 96 puits (vWR, USA) selon l'expérience effectuée.

Les cellules peuvent être congelées à -80°C ou -150°C. Dans ce cas, les culots cellulaires sont repris dans un milieu de congélation spécifique contenant du DMSO (Recovery™ Cell Culture Freezing Medium, Gibco™, USA).

C. Extraction des protéines totales

Les fibroblastes cultivés dans des plaques 6 puits sont lavés avec du DPBS 1X. Les cellules sont soumises à une solution de tampon de lyse NP40 et d'inhibiteurs de protéases de concentration finale 1X (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, USA) à température ambiante pendant 5 minutes. Les cellules sont récupérées avec un grattoir à cellule et transférées dans un tube eppendorf de 2mL placé dans la glace pendant 30 minutes et vortexé toutes les 5 minutes. La solution est soniquée 4 fois pour éliminer l'ADN (30 secondes on/30secondes off) à 4°C avant d'être centrifugée à 10,000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et stocké à -20°C ou -80°C.

D. Quantification des protéines

La quantification des protéines est réalisée avec le kit Pierce BCA Protein Assay selon le protocole recommandé par le fournisseur (Thermo Scientific, USA). Pour cela, nous utilisons une gamme étalon allant de 5 à 1000 μ g/mL. Les échantillons sont ensuite dosés par un Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, USA) à la longueur d'onde de 562nm permettant de définir l'absorbance.

E. Western Blot

Une quantité de 15 à 40 μ g de protéines est mélangée avec un tampon de charge et un agent réducteur. La solution est dénaturée à 95°C pendant 5 minutes et placée dans la glace. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel Bis-Tris 10-12% (BIO-RAD Criterion™, USA). Pour suivre la phase de migration et déterminer le poids moléculaire des échantillons, 2 marqueurs de taille sont utilisés : Chameleon ladder (LI-COR, USA) et Spectra ladder (Thermo Scientific, USA). La migration s'effectue dans une solution de XT MES 1X (BIO-RAD, USA) pendant 1h à 150V. Le gel est transféré sur une membrane Immobilon FL® transfert membrane PVFD (Merck Millipore Ltd., Irlande) activée dans l'éthanol pendant 30 secondes. Le transfert s'effectue à 100V pendant 1h 30 minutes. La membrane est ensuite incubée dans une solution TBS 1X et tampon de blocage Odyssey (ROCKLAND™, USA) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. La membrane est incubée avec une solution d'anticorps primaire (**Tableau 3**) pendant 3 heures à température ambiante ou pendant 6h à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5 minutes dans une solution de TBS 1X (Thermo Scientific, USA) et Tween 0.1% (SIGMA, USA), puis incubée dans une solution d'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est lavée 3 fois pendant 5 minutes dans une solution de TBS1X + 0.1% de Tween 20, puis une fois par une solution de TBS 1X. La membrane est révélée par le LI-COR® Odyssey CLx.

F. Fixation des cellules

Les fibroblastes sont lavés par une solution de DPBS 1X pendant 10 minutes. Ils sont fixés pendant 10 minutes par une solution de paraformaldéhyde à 4% (Electron Microscopy Sciences, USA). Un nouveau lavage est effectué dans du DPBS 1X pendant 10 minutes. Trois bains successifs de 3 minutes dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (70, 90 et 100%) sont réalisés pour déshydrater les cellules. Les lames sont placées à température ambiante pendant 20 minutes pour éliminer l'excès d'éthanol, puis elles sont congelées à -80°C.

G. Immunofluorescence

Les lames sont décongelées et incubées 10 minutes dans une chambre à vide, humide avec 200µL d'une solution de triton (DBPS 1X, triton 0,5% et inhibiteurs de protéases) et recouvertes d'une lamelle. Les lames sont saturées par une solution BSA + cocktail d'inhibiteurs de protéases pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite incubées dans une solution d'anticorps primaire (**Tableau 5**) anti-lamine diluée à 1/300^{ème} dans du réactif BSA (DPBS 1X, sérum albumine de boeuf fraction V, inhibiteurs de protéases) pendant 2 heures à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Deux lavages au DPBS 1X pendant 5 minutes sont réalisés avant d'incuber les lames avec une solution d'anticorps secondaire diluée au 1/400^{ème} dans du réactif BSA pendant 1 heure à température ambiante. Deux lavages au DPBS 1X pendant 5 minutes sont effectués avant dépôt d'une solution de Vectashield-DAPI (500ng/mL) (Vector laboratories, USA) puis les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

H. Microscopie

Les lames sont observées et lues sur un microscope à fluorescence Apo Tome.2 avec Axio Zoom. V16 (Zeiss, Allemagne). Les images produites sont analysées par le logiciel imageJ 1.46r Java.

Tableau 4 : Tableau décrivant les anticorps primaires utilisés en immunofluorescence et en Western Blotting

N.U : Non Utilisé

Anticorps	Référence	Monoclonal/Polyclonal	Espèce	Dilution en WB	Dilution en IF
Lamine A/C	Sc20681 Santa Cruz Biotechnology	Polyclonal	Lapin	1/1000	1/200
Lamine A/C	Sc6215 Santa Cruz Biotechnology	Polyclonal	Chèvre	1/1000	1/400
GAPDH	mAbcam 9484 Abcam	Monoclonal	Souris	1/1000	N.U
Lamine B1	SAB1306342 Sigma-Aldrich	Polyclonal	Lapin	1/1000	N.U
Emerine	SBP3500211 Sigma-Aldrich	Polyclonal	Lapin	1/1000	N.U
BANF1	ab129184 Abcam	Monoclonal	Lapin	1/1000	N.U
MAN1	HPA025078 Sigma-Aldrich	Polyclonal	Lapin	1/1000	N.U
LAP2 α	ab226336 Abcam	Polyclonal	Lapin	1/1000	N.U

II. Transfection

A. Mutagenèse dirigée

Les trois mutations faux-sens identifiées du gène *LMNA* c.1232G>A, c.1745G>T et c.1893G<A ont été introduites dans le cDNA *LMNA* en utilisant le kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Le plasmide contient un cDNA prélamine A normal fusionné au cDNA GFP (pBABA-puro-wt-lamin A (Addgene®, USA)). Le cDNA *LMNA* est initialement cloné dans le vecteur pEGFP-C1 (Takara Bio, USA). Les amorces contenant les 3 mutations *LMNA* ont été conçues en utilisant le programme QuickChange Primer Design Program (**Tableau 6**). La synthèse des brins mutants est effectuée par hybridation des amorces sur le plasmide non-muté préalablement dénaturé puis élongation par l'enzyme *PfuUltra* High Fidelity DNA Polymerase (Agilent Technologies, USA). Une étape de digestion de l'ADN double brin parental est ensuite effectuée par l'enzyme de restriction DpnI. Les plasmides sont ensuite amplifiés dans des bactéries électrocompétentes NEB 10 β. La sélection des bactéries transformées est effectuée sur Kanamycine puis l'amplification bactérienne est effectuée dans du milieu de culture LB + Kanamycine 50μg/ml. L'extraction et la purification des plasmides est effectuée en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Allemagne). La présence de la mutation dans le plasmide est ensuite vérifiée par séquençage (**Tableau 7**) avant d'effectuer la transfection dans des cellules contrôle.

Mutation LMNA	Primer "Forward": 5'-3'	Primer "reverse": 5'-3'
c.1893G>A	CTACCGCAGTGTGGGGGACAGT GGGGGTGGCAGC	GCTGCCACCCCCACTGTCCCCAC ACTGCGGTAG
c.1745G>T	CACGGTGCGCGAGAGCAGGTTG TACTC	GAGTACAACCTGCTCTCGCGCACC GTG
c.1232G>A	CCCAGACACAGGATGGGGGCAG CGTCACC	GGTGACGCTGCCCCCATCCTGTGT CTGGGATGAG

Tableau 5 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Primers LMNA cDNA	Tm	Séquence 5'-3'
1-3 F	62	TCCGAGCAGTCTCTGTCCTT
1-3 R	62	TCTCAAACCTCACGCTGCTTC
4-6 F	60	GCAGACCATGAAGGAGGAAC
4-6 R	58	AGTTTGCGCTTTTGGTGAC
7-9 F	64	GGCGAGGAGGAGAGGCTAC
7-9 R	62	GTCGTCCTCAACCACAGTCA
10-12 F	60	GGAAGGCACAGAACACCTG
10-12 R	62	GGCATGAGGTGAGGAGGAC

Tableau 6 : Amorces utilisées pour le séquençage direct du cDNA LMNA

B. Transfection de plasmides

Les cellules témoin AG7095 (Tableau 3) sont transfectées dans des Lab-tek 4 puits avec le kit jet Prime (Polyplus Transfection, France). 30,000 cellules sont déposées dans chaque puits. A 70% de confluence, les fibroblastes sont transfectés soit avec un plasmide exprimant une prélamine A sauvage, soit avec un plasmide exprimant une prélamine A mutée. Deux quantités différentes de plasmides sont testées : 250ng et 500ng. Le milieu de culture contenant le réactif de transfection est remplacé par du milieu complet au bout de 6 heures d'incubation, puis les cellules sont fixées 48 heures après la transfection.

C. Transfection de siRNA

Le siRNA utilisé cible spécifiquement la région 3'UTR du transcrit *LMNA-prélamine A* (Eurogentec, Belgique). La séquence est reportée dans le **tableau 7**.

Les fibroblastes sont mis en culture dans des Labtek 4 puits et des plaques 6 puits. Respectivement 40,000 et 150,000 cellules sont déposées par puits. A 60% de confluence, 3 concentrations de siRNA (10, 30 et 50 nM) sont transfectées à l'aide du kit Jetprime selon les recommandations du fournisseur (Polyplus Transfection, France). Le milieu de culture est changé 6 heures après la transfection et les cellules sont fixées 48 heures après la transfection de siRNA.

	Sens	Séquence 5'-3'
siRNAs	Sens	5'-UUUUCUAAGAGAAGUUAUU-3'
Oligonucléotide anti-sens (siRNAs) contrôle	Séquence scrambled	5'-AUCGGCUUGUCGCGUGAGCGAUCGA-3'

Tableau 7 : Séquence d'ARN interférent (siRNA) anti-lamine A et contrôle ("scrambled")

III. Tests de sénescence

A. Temps de doublement de population

Le temps de doublement de population a été mesuré entre les passages 10 et 25. Les cellules sont repiquées tous les deux jours. A chaque passage, 600,000 cellules sontensemencées dans des flasques T25. Les cellules sont comptées manuellement par KOVA slide ou par comptage automatique par Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Scientific, France). Le temps de doublement de population est estimé en calculant le rapport $\log_2(D/D_0)$ où D représente le nombre de cellules comptées à un passage P et D_0 représente le nombre de cellules mises en culture soit 600,000 cellules. L'expérience a été réitérée au minimum à 3 reprises (Martens et al. 2000).

B. Sénescence associée à la β -galactosidase

La sénescence des cellules est évaluée par mesure de l'activité β -galactosidase avec Beta-Glo[®] Assay System (Promega, France). 10000 fibroblastes pour 100 μ L sont déposés dans des puits d'une plaque 96 puits blanche (adaptée pour la mesure d'une luminescence) et chaque lignée cellulaire est déposée en quadruple. Après 48 heures, le milieu de culture est changé par du DMEM sans red phénol supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine 200mM, 1% de PSA (Pénicilline-Streptomycine-Amphotéricine) pour éviter les interférences pouvant affecter le signal de luminescence. 100 μ L de Beta-Glo[®] sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est agitée sur un agitateur magnétique pendant 30 secondes et ensuite incubée pendant 30 minutes à température ambiante. La luminescence mesurée par l'appareil GloMax[®]

(Promega, France) est proportionnelle à la quantité de β -galactosidase produite par les cellules. Cinq expériences indépendantes ont été réalisées sur chaque lignée cellulaire.

C. Incorporation de BrdU

La prolifération cellulaire est évaluée par la mesure de l'incorporation de BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine) pendant la synthèse d'ADN. L'incorporation de BrdU est réalisée à l'aide du kit Cell proliferation ELISA BrdU colorimetric (Roche, France). Les cellules sont mises en culture dans des plaques 96 puits transparentes à raison de 10000 par puits dans un volume de 100 μ L. Chaque lignée cellulaire est déposée en quadruple. Au bout de 24 heures d'incubation, 10 μ L de BrdU sont ajoutés dans chaque puits pendant 24 heures supplémentaires. Le milieu contenant le BrdU est ensuite éliminé et remplacé par une solution de FixDenat permettant la fixation et la perméabilisation cellulaire ainsi que la dénaturation de l'ADN afin que l'anticorps anti-BrdU puisse agir. Les plaques sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution de FixDenat est jetée par retournement et remplacée par une solution d'anticorps monoclonal anti-BrdU conjugué à la peroxydase (POD). Les plaques sont incubées pendant 90 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du DPBS 1X avant ajout de 100 μ L de substrat TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine) entraînant une coloration bleue sous l'action de la peroxydase. Les plaques sont incubées 10 minutes jusqu'à ce que la coloration soit suffisante pour la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie. 25 μ L de H₂SO₄ à une concentration de 1M sont ajoutés afin de stopper l'action de la peroxydase et permet ainsi de stabiliser la solution qui a pris une coloration jaune. L'absorbance peut être mesurée à la λ_{\max} de 450 nm (λ_{\max} de référence 600nm) sur l'appareil GloMax[®]. Les expériences sont réalisées à minima 5 fois.

IV. Séquençage haut débit

L'ADN est extrait à partir de fibroblastes de patients en utilisant le kit NucleoSpin® Tissue XS (Machinery-Nagel, Allemagne) et purifié à l'aide du kit QIAamp® DNA Micro Kit (Quiagen, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Le design des régions ciblées, constituant la librairie, est réalisé par HaloPlex design wizard (Agilent Technologies, City, State Abreviation, USA) selon HaloPlex Target Enrichment For Ion Torrent Sequencing Version D4. L'ensemble des fragments d'ADN à séquençer sont quantifiés par le Qubit® Fluorometer (Thermo Scientific, USA) et qualifiées par le Bioanalyzer instrument (High Sensitivity DNA Kit, Agilent) pour établir un mélange équimolaire des échantillons.

ION PI™ Template OT2 200 Kit v2 sur Ion One Touch™ 2 System (Thermo Scientific, USA) permet l'amplification des séquences ADN cibles en PCR par émulsion et l'enrichissement des billes magnétiques (Ion Sphere Particles = ISP). La qualité des ISP est établie par le Qubit® fluorometer. Les ISP sont chargées et séquencées par Ion PI™ Chip 200 Kit v2 utilisant Ion PI™ Sequencing 200 Kit v2 sur Ion Torrent PGM™ Sequencer (Thermo Scientific, USA). Les séquences d'ADN contenues sur les ISP sont séquencées selon un panel de 82 gènes codant pour les lamines, des partenaires protéiques des lamines, des gènes impliqués dans le diabète de type 2, les lipodystrophies et l'obésité. La matrice de séquençage comprenant les amorces et la polymérase permet de séquençer chaque brin positionné sur les ISP. Les nucléotides ajoutés lors du séquençage sont détectés selon une variation de pH et sont traduits en données brutes par des ionogrammes. Les données brutes sont alignées avec le logiciel fourni incluant Ion Proton System pour générer les fichiers BAM. L'analyse de couverture et la profondeur des séquences sont réalisées par le logiciel BEDtools v2.17. Les variants sont identifiés en utilisant

Torrent Browser Variant Caller (version 4.0.2), annotés et priorisés par le logiciel VarAFT incluant le software Annovar (Desvignes et al. 2018).

V. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism v.6.07 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un test non paramétrique Mann-Whitney avec une p-value < 0.05 est utilisé pour comparer les échantillons indépendants deux à deux (contrôle vs patient). Une analyse de variance (ANOVA) deux voies est réalisée pour comparer les différentes courbes obtenues pour le temps de doublement de population et évaluer l'impact des passages et des lignées cellulaires sur le temps de doublement de la population. Le seuil de significativité utilisé est de : $p < 0,05$.

Résultats

I. Description clinique des patients

A. Patient avec une mutation du gène *ZMPSTE24* :

Le patient 1 âgé de 49 ans, est originaire de Nouvelle-Calédonie, fumeur et rapporte une consommation d'alcool régulière. Il mesure 1,95 mètres, pèse 144 kilogrammes ce qui donne un IMC de 37.9 kg/m² (obésité morbide). Le tour de hanche et le tour de taille font respectivement 120 et 130 centimètres alors que le tour de cuisse est de 63 centimètres. L'examen clinique montre une hypertrophie du tissu adipeux au niveau du cou (« bosse de bison ») et de la face mais ne révèle pas de lipoatrophie des membres inférieurs. Il existe un acanthosis nigricans au niveau des régions axillaires et cervicales. Il présente une obésité androïde, une hypertension artérielle et une dyslipidémie avec une hypertriglycéridémie et un taux d'HDL bas. Le diabète de type 2, déclaré à l'âge de 39 ans, est traité par l'association d'une insulinothérapie et des antidiabétiques oraux. Il n'y a pas d'hypertrophie ou de faiblesse musculaire malgré un taux en créatine kinase légèrement augmenté. L'examen hépatique montre une hépatomégalie avec une stéatose hépatique sans augmentation des enzymes hépatiques. L'examen cardiaque révèle une diminution de la fraction d'éjection systolique entre 25 et 30% qui nécessite un traitement par β -bloquant, diurétique et inhibiteur de l'enzyme de conversion. Le patient présente également un taux sérique d'adiponectine bas (1 μ g/mL (valeurs usuelles : 3.8-11.8 μ g/mL)) et un taux sérique de leptine élevé (49.8ng/mL (valeurs usuelles : 3.3-8.7ng/mL)). Par séquençage direct, une mutation hétérozygote faux-sens du gène *ZMPSTE24*, c.1312 C>T p.(Leu438Phe) a été mise en évidence. (**Tableau 7**).

B. Patients présentant une mutation du gène *LMNA* :

1. Patient 2

Le patient 2 est un fumeur actif (40 paquets année) et rapporte une consommation d'alcool journalière (<30g/jour). L'IMC est de 36.5 kg/m² correspondant à une obésité morbide. Le tour de taille est de 126 centimètres et le ratio taille/hanches est de 1.16. La masse graisseuse est évaluée à 35% par analyse bioélectrique de l'impédance. L'examen clinique montre une anomalie de répartition androïde du tissu adipeux sans lipoatrophie des membres inférieurs. Il est atteint d'un diabète de type 2 diagnostiqué à l'âge de 46 ans traité par antidiabétiques oraux (sulfonylurée), présente une hypertension artérielle et une anomalie du bilan lipidique caractérisée par une hypertriglycémie, traitée par de fortes doses de statines (Atorvastatine 80mg/jour). Il présente une maladie de Basedow diagnostiquée à 1 an après le diagnostic du diabète. Le patient a développé une ischémie cardiaque avec une fraction d'éjection systolique diminuée (35%) et une sténose carotidienne. Il souffre d'une stéatose hépatique et d'une cirrhose hépatique en rapport avec la consommation d'alcool. Il présente également une néphropathie d'installation rapide et progressive (**Tableau 7**).

Les analyses de biologie moléculaire ont mis en évidence une mutation hétérozygote faux-sens du gène *LMNA*, c.1232 C>T p.(Gly411Asp) (**Tableau 8**).

2. Patient 3

Le patient 3 est une femme âgée de 51 ans, présentant un IMC de 37.1 kg/m² (obésité morbide) avec une circonférence de la taille de 118cm. L'examen clinique montre un syndrome cushingoïde avec un hirsutisme de la face, associé à une obésité androïde sans lipoatrophie des membres inférieurs. Elle a développé un diabète de type 2 diagnostiqué à l'âge de 26 ans et traité dans un premier temps, par metformine et analogue de GLP-1, puis à partir de l'âge de

40 ans, par un traitement à base d'insuline. Les membres de sa famille sont atteints d'un diabète de type 2 mais avec un âge de survenue beaucoup plus tardif (après 60 ans).

Le patient 3 présente également une hypertension artérielle et une dyslipidémie caractérisée par

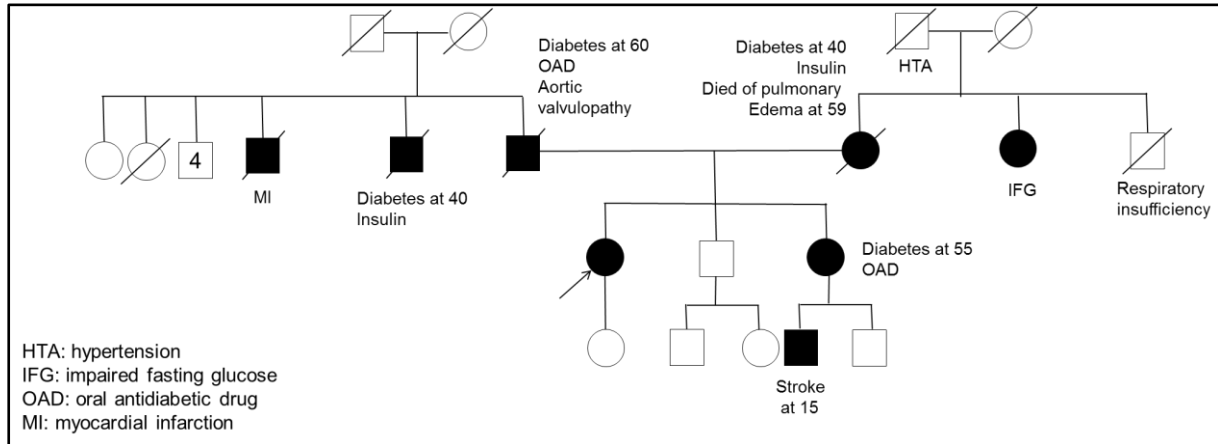


Figure 15 : Arbre généalogique du patient 3

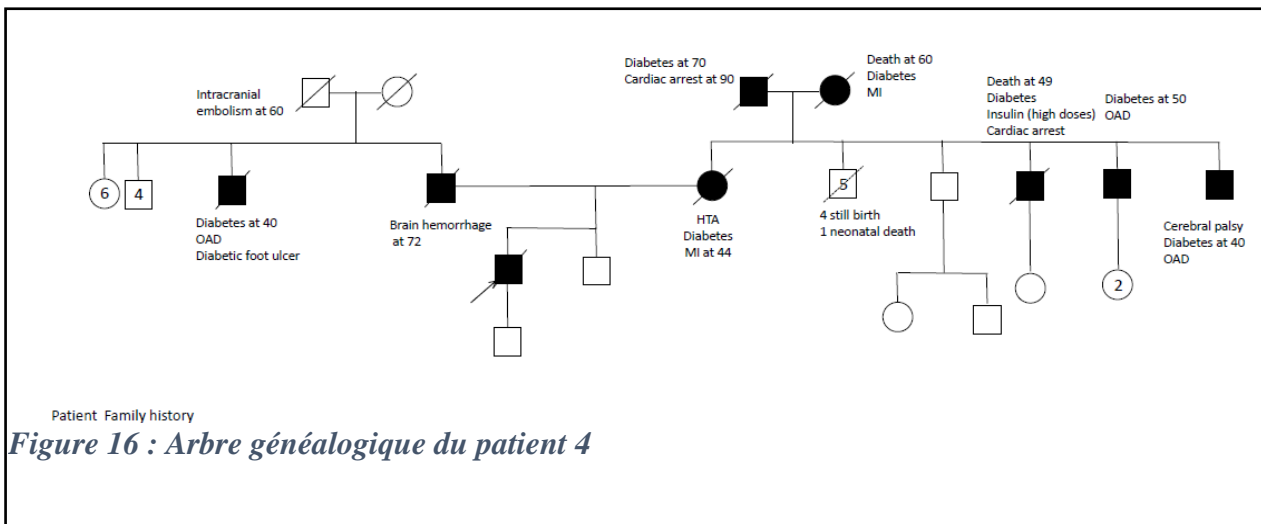
une hypertriglycéridémie sévère malgré un traitement par statines et fibrates, des myalgies chroniques attribuées au traitement par anticholestérolémiant, un asthme, des apnées du sommeil et un syndrome coronarien qui a nécessité la pose de 3 stents à l'âge de 42 ans. Les examens cardiaques ont révélé une hypertrophie ventriculaire gauche et une pathologie des artères coronaires. L'examen hépatique révèle une stéatose hépatique sans augmentation des transaminases. Il existe également une polykystose ovarienne. Les examens spécifiques biologiques révèlent une hyperleptinémie (39.3 ng/mL (valeurs usuelles : 3.3-8.7 ng/mL)) et un taux bas d'adiponectine (1.34 µg/mL (valeurs usuelles : 3.8-11.8 µg/mL)). Le taux de leptine élevé ainsi que l'absence de lipotrophie des membres inférieurs sont les différences principales avec le syndrome de Dunnigan dans lequel la leptine est effondrée et la lipotrophie est marquée sur les membres inférieurs.

Les analyses de biologie moléculaire ont mis en évidence une mutation hétérozygote faux-sens du gène *LMNA* c.1893G>A p.(Gly631Asp) jamais décrite dans la littérature. Il n'a pas été

possible de rechercher la mutation chez les parents de cette patiente, sa sœur n'est pas porteuse de la mutation et ne présente pas le tableau de SM sévère. Les éléments cliniques et biologiques sont résumés dans le **tableau 7**.

3. Patient 4

Le patient 4 est un homme âgé de 48 ans. Il ne présente pas d'anomalie notable de la répartition du tissu adipeux et son IMC est égal à est 28.7 kg/m². Il présente un diabète de type 2 découvert à l'âge de 34 ans traité par insulinothérapie. Les membres de la famille présentent des antécédents de diabète de type 2. La mère du patient est décédée d'un infarctus du myocarde à l'âge de 44 ans et était atteinte d'un diabète de type 2 et d'une hypertension artérielle. Du côté maternel, certains membres présentent également un diabète de type 2 (**Figure 16**).



Description clinique des patients

Le diabète est traité par insulinothérapie. Le patient est atteint d'une dyslipidémie caractérisée par une hypertriglycémie sévère. Les examens cardiaques et musculaires se sont révélés normaux.

Les analyses de biologie moléculaire ont mis en évidence une mutation hétérozygote faux-sens du gène *LMNA*, c.1745 G>T p.(Arg582Leu) (**Tableaux 9 et 10**). Cette mutation n'est pas rapportée dans la base de données Exac. Elle est rapportée une fois dans la base de données ClinVar et associée à un effet incertain car mal documenté. Une mutation sur le même résidu mais entraînant le remplacement du résidu arginine par une histidine a été rapportée associée à une forme classique de lipodystrophie familiale partielle. De plus, une autre mutation entraînant la modification du même résidu arginine en cystéine a été mise en évidence dans une famille soit à l'état homozygote, soit hétérozygote. Elle est associée, à des degrés de sévérité variable, à une lipodystrophie (Montenegro et al. 2018).

Description clinique des patients

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Genre	Masculin	Masculin	Féminin	Masculin
Âge	50 ans	55 ans	51 ans	48 ans
IMC	37.9 kg/m ²	36.5 kg/m ²	37.1 kg/m ²	28.7 kg/m ²
Hypertension artérielle	Oui	Oui	Oui	Oui
Aspect physique	Obésité androïde	Obésité androïde	Obésité androïde	Répartition androïde du tissu adipeux
Anomalie du bilan lipidique	Hypertriglycémie Stéatose hépatique	Hypertriglycémie	Hypertriglycémie Stéatose hépatique	Hypertriglycémie sévère
Diabète de type 2 et âge de survenue	Oui à 39 ans	Oui à 46 ans	Oui à 26 ans	Oui à 34 ans
Atteinte musculaire	N.P	N.P	Myalgie chronique	N.P
Atteinte cardiaque	Diminution de la fraction d'éjection systolique	Ischémie cardiaque Sténose carotidienne	Syndrome coronarien Hypertrophie ventriculaire gauche	N.P
Stéatose hépatique	Oui	Non	Oui	Non
Mutation	<i>ZMPSTE24</i> c.1312C>T p.Leu438Phe	<i>LMNA</i> c.1232G>A p.Gly411Asp	<i>LMNA</i> c.1893G>A p.Gly631Asp	<i>LMNA</i> c.1745G>T p.Arg582Leu
Autres	Acanthosis nigricans	Maladie de Basedow Néphropathie	Asthme Apnée du sommeil Polykystose ovarienne	N.P
Critères du syndrome métabolique	4/5	5/5	4/5	3/5

Tableau 8 : Description clinique et biologique des patients portant une mutation des gènes LMNA et ZMPSTE24 (NP : non présent)

C. Patients avec aucune mutation identifiée

Au cours d'une étude précédente, 5 patients atteints de syndrome métabolique sévère et dont les fibroblastes présentaient un taux d'anomalies nucléaires élevé ont été identifiés (Dutour et al 2011). Ces patients ne présentaient pas de mutation dans les gènes *LMNA* ou *ZMPSTE24* ni dans les gènes codant pour *ICMT*, *FNTA* et *FNTB*, des gènes codant pour d'autres protéines impliquées dans la maturation de la prélamine A. Le patient le plus jeune avait 44 ans et le plus vieux 77 ans. Un seul patient n'était pas diabétique. Tous présentaient une obésité androïde avec un $IMC > 35 \text{kg/m}^2$ associé soit à une hypertriglycéridémie sévère, soit à une stéatose hépatique. Certains de ces patients souffraient de myalgies sous des formes diverses (n=3) ou présentaient des troubles cardiaques (n=2) dont une cardiomyopathie dilatée et une arythmie ventriculaire.

II. Etude du patient ayant la mutation du gène *ZMPSTE24*

Pour mémoire, le gène *ZMPSTE24* code pour l'enzyme assurant l'étape finale de la maturation de la prélamine A en lamine A. Les mutations du gène *ZMPSTE24* entraînent une diminution de la capacité de maturation de la prélamine A en lamine A et ainsi une accumulation de prélamine A farnésylée.

Afin de confirmer le rôle pathogène de la mutation du gène *ZMPSTE24* sur le phénotype du patient 1, nous avons réalisé un certain nombre de tests visant d'une part, à diminuer la quantité de prélamine A produite dans les fibroblastes du patient pour tenter de corriger le phénotype cellulaire et d'autre part, à montrer que les cellules de ce patient présentent bien un défaut de prolifération et une sénescence accélérée, ce qui est observé classiquement en cas d'accumulation de prélamine A.

A. Analyse de la mutation *in silico*

Les résultats de biologie moléculaire ont mis en évidence une mutation hétérozygote faux-sens du gène *ZMPSTE24*, c.1312 C>T (rs116771294). Elle entraîne la modification de l'acide aminé aliphatique leucine, par un acide aminé aromatique phénylalanine : *ZMPSTE24* : p.Leu438Phe. Cette mutation est décrite pathogène par les différents logiciels d'analyse bio-informatique (Polyphen 2.0, Mutation Taster et UMD Predictor (Score de pathogénéité : 75/100). La mutation est rapportée 10 fois dans Exac, uniquement dans la population d'Asie de l'est. La fréquence dans la population globale est de $8.239.10^{-5}$. Elle est retrouvée 18 fois dans gnomAD, également dans la population de l'Asie de l'est, avec une fréquence de $6.854.10^{-5}$.

B. Caractérisation des anomalies nucléaires

Afin de confirmer les résultats de l'étude de la cohorte en 2011, nous avons déterminé le taux d'anomalies nucléaires et les avons caractérisées. Les anomalies nucléaires ont été étudiées par immunofluorescence sur deux types cellulaires : lymphoblastes et fibroblastes. Le noyau des cellules est coloré spécifiquement par DAPI ce qui permet d'apprécier visuellement les anomalies nucléaires. Le marquage spécifique par anticorps anti-lamine A permet de déterminer les anomalies de forme et les anomalies de répartition de la lamine A. On retrouvait bien une augmentation spécifique des anomalies nucléaires par comparaison avec les cellules contrôles ainsi qu'une diminution du signal en immunofluorescence et un marquage hétérogène démontrant une anomalie de répartition de la protéine. Le comptage des anomalies nucléaires révèle majoritairement la présence d'anomalies de forme et de taille ($54\pm 6.3\%$), ainsi qu'une répartition anormale de la lamine A caractérisée par un nombre accru d'inclusions cytoplasmiques et un marquage lamine A non uniforme en mottes dans le nucléoplasme ($39\pm 7.5\%$) (**Figure 17**). Ce résultat est confirmé sur les fibroblastes à différents passages. En parallèle, un marquage lamine B et émerine ne montre pas d'anomalie caractéristique.

C. Tests de prolifération cellulaire et test de sénescence

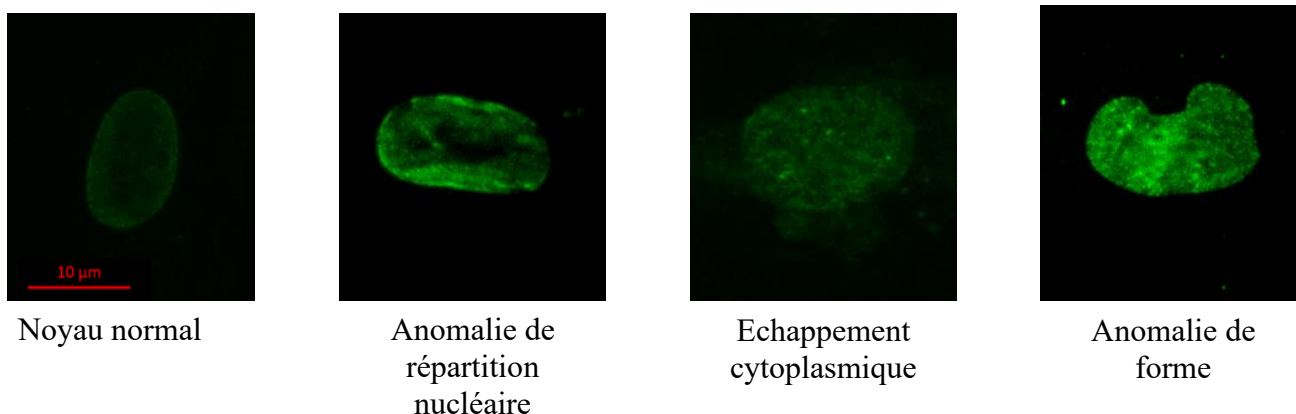


Figure 17 : Différents profils d'anomalies nucléaires observés sur les fibroblastes du patient 1 en immunofluorescence (Grossissement x100)

Marquage vert : Lamine A

1. Temps de doublement de population

La prolifération cellulaire est évaluée par le temps nécessaire au doublement d'une population de cellules (PDL pour Population Doubling Level). L'expérience consiste à mesurer la capacité des cellules à proliférer en mettant en culture un nombre fixe de cellules (600,000 cellules) et en évaluant le nombre de cellules obtenues après 2 à 3 jours. Nous constatons que le PDL des cellules contrôle reste stable entre les passages P10 et P23. Les fibroblastes portant la mutation de ZMPSTE24 p.Leu438Phe ont un taux de prolifération significativement inférieur entre les passages P10 et P20 (Test ANOVA, $p < 0.0001$) notamment à partir du passage P16. Les fibroblastes mutés ont donc un temps de doublement de population significativement diminué par rapport aux fibroblastes contrôles (**Figure 18**).

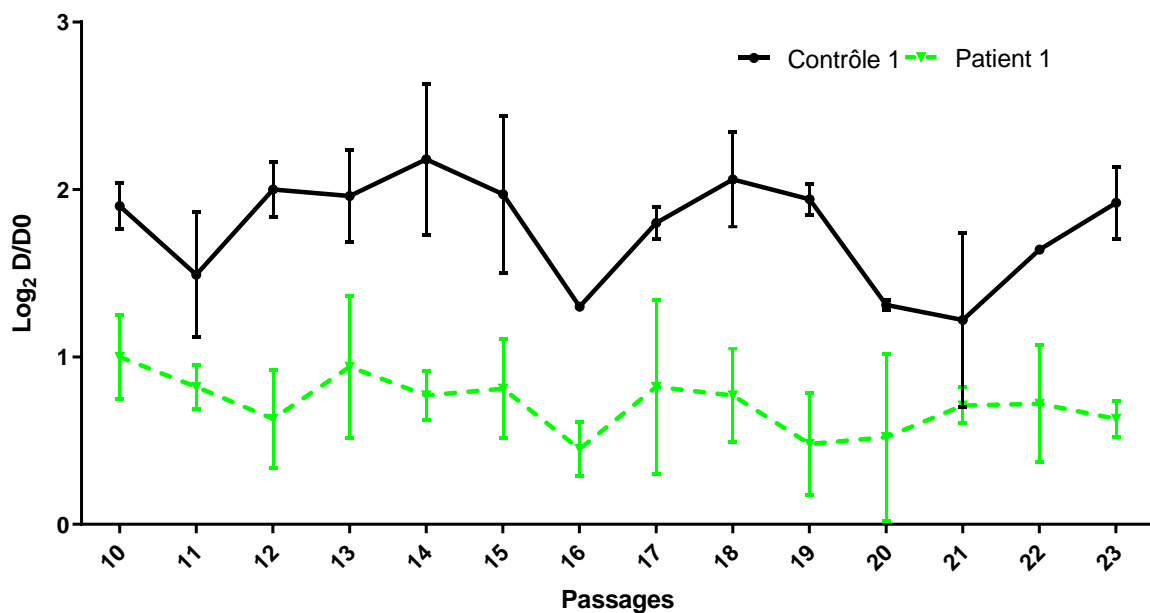


Figure 18 : Temps de doublement de population mesuré entre les passages P10 et P23 pour les fibroblastes témoins et les fibroblastes du patient 1 (n=3).

2. Incorporation BrdU

Ce test consiste en l'incorporation d'une base modifiée (BrdU) en phase S du cycle cellulaire permettant d'évaluer la capacité des cellules à se répliquer. Nous observons une diminution significative de l'incorporation BrdU ($p=0.0176$) par les fibroblastes mutés ce qui traduit une diminution significative du taux de réplication cellulaire par rapport aux cellules contrôle (Figure 19).

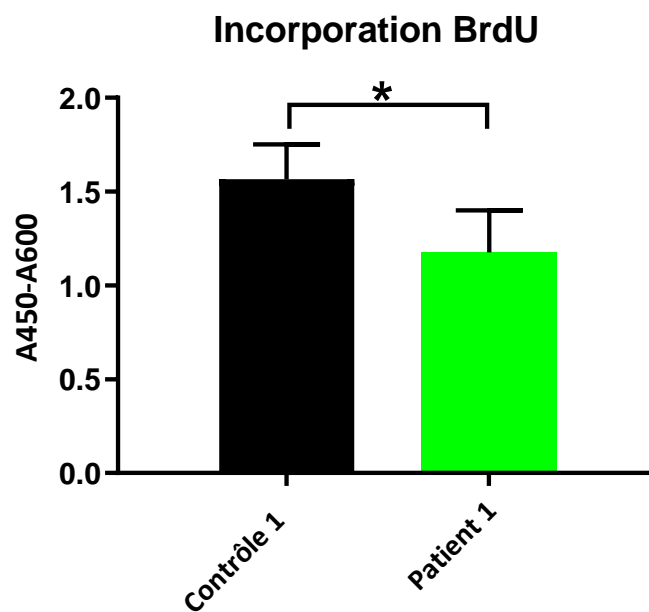


Figure 19 : Mesure de l'incorporation BrdU dans les fibroblastes témoins et les fibroblastes mutés ZMPSTE24 (n=6)

Significativité : * $p < 0.05$.

3. Essai β -galactosidase

L'essai β -galactosidase permet de définir le taux de sénescence des cellules par la production de β -galactosidase mesurée par une réaction de luminescence. Nous constatons, à passage identique, une augmentation significative de la luminescence des fibroblastes mutés comparés aux fibroblastes contrôle ($p=0.0079$). Le traitement des fibroblastes du patient par siRNAs dirigés contre le transcrite *LMNA* restaure un niveau de luminescence comparable à celui des fibroblastes contrôle traduisant le fait que le taux de sénescence revient à un niveau normal quand la production de prélamine A est freinée. En résumé, les fibroblastes mutés présentent une sénescence significativement augmentée comparés aux fibroblastes contrôle ($p=0.0159$) et cette sénescence est prévenue par un traitement par ARN interférence dirigé contre le transcrite *LMNA* (Figure 20).

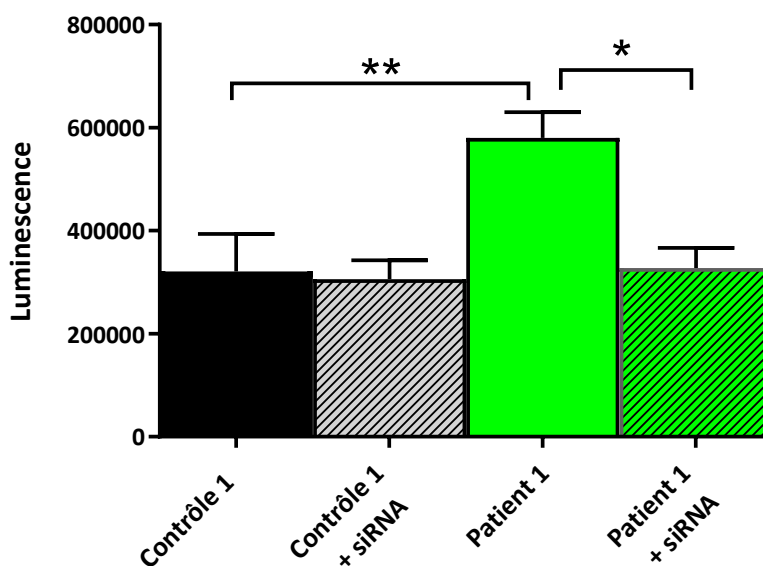


Figure 20 : Mesure de l'activité β -galactosidase sur les fibroblastes contrôles et les fibroblastes mutés ZMPSTE24 après traitement par siRNAs ($n=5$).

Significativité : * $p<0.05$; ** $p<0.01$

D. Modulation de l'expression de la lamine A par transfection d'ARN interférent

Dans le but de préciser le rôle de la lamine A dans la formation des anomalies nucléaires observées, nous avons utilisé un siRNA qui se fixe sur la région 3'UTR spécifique du transcrite *LMNA*. Son rôle est d'empêcher la traduction du transcrite en prélamine A et donc de diminuer la quantité de prélamine A se produisant dans les cellules du patient en raison de la baisse d'activité de ZMPSTE24. L'effet du siRNA est comparé avec celui d'un siRNA dit « scrambled » c'est-à-dire de séquence non spécifique n'ayant aucun effet sur les transcrits produits par la cellule ainsi qu'à des cellules non traitées par siRNA. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'efficacité du siRNA anti-lamine A sur la diminution de la quantité de lamine A mature traduite dans les fibroblastes par Western Blot. L'analyse des résultats de Western Blot montre une diminution significative de la production de lamine A dans les fibroblastes transfectés avec le siRNA anti-lamine. La diminution est évaluée entre 30 et 40% (Figure 21).

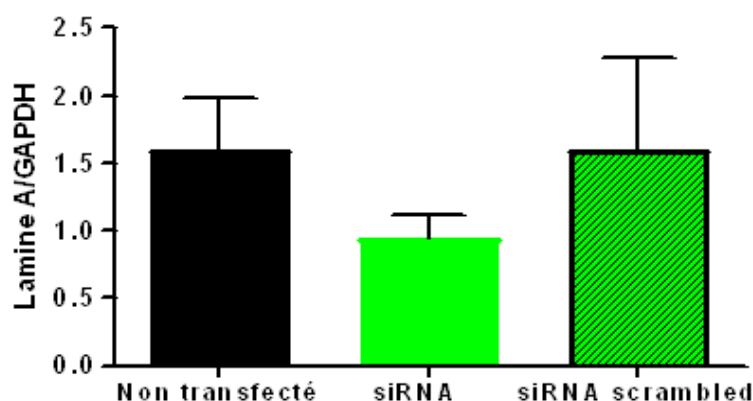


Figure 21 : Quantification par Western Blot de la quantité de lamine A traduite après traitement par siRNAs sur les fibroblastes du patient muté ZMPSTE24 (n=3)

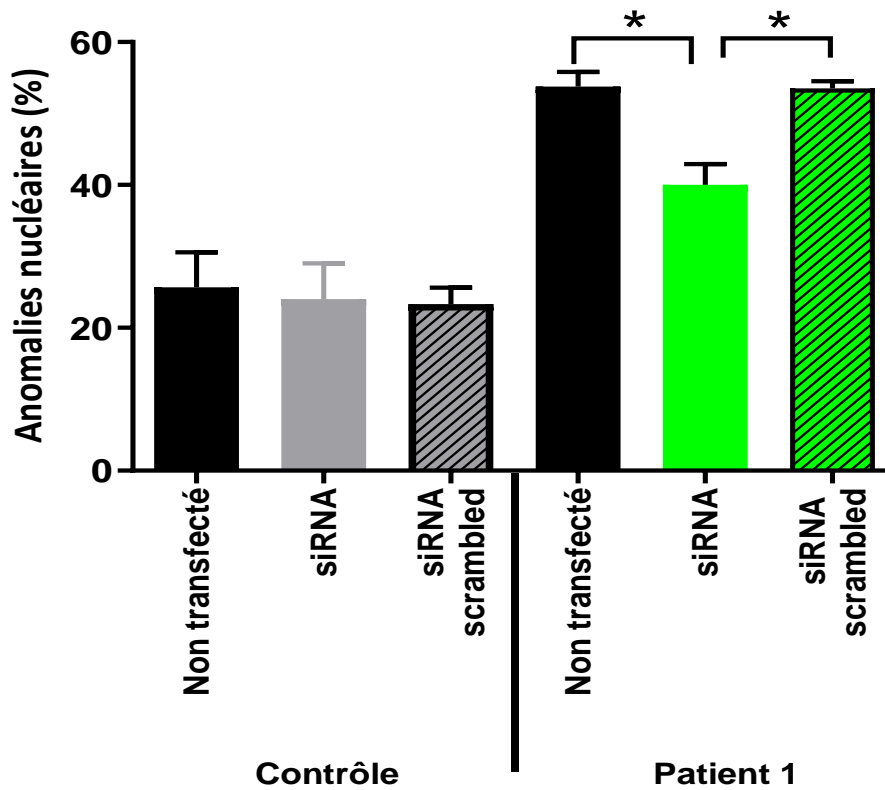


Figure 22 : Pourcentage d'anomalies nucléaires observées en immunofluorescence après traitement par siRNAs (n=4).

Significativité : * $p < 0.005$

En immunofluorescence, les fibroblastes sont marqués par des anticorps anti-lamine A et par DAPI. Avant et après traitement par siRNAs, nous évaluons le taux d'anomalies nucléaires observées. Les fibroblastes traités par siRNAs montrent une diminution significative du taux d'anomalies nucléaires ($p=0.0268$) (**Figure 22**).

III. Etude des patients ayant une mutation du gène LMNA

A. Analyse des mutations in silico

La fréquence des mutations caractérisées est déterminée dans la population générale grâce aux bases de données publiques Exac et gnomAD. Les logiciels de prédiction bio-informatique Polyphen, Mutation Taster et UMD predictor nous permettent d'apprécier la pathogénicité théorique du variant identifié. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	Mutation	Exac	gnomAD	Origine géographique	Mutation Taster	UMD Predictor	Polyphen
Patient 2	LMNA p.Gly411Asp rs267607647	2.5.10 ⁻⁵	1.22.10 ⁻⁵	Asie du sud	Disease causing	Probablement pathogène Score : 66	Non Pathogène Score :0.134
Patient 3	LMNA p.Gly631Asp rs267607648	8.676.10 ⁻⁶	8.198.10 ⁻⁶	Européen non Finnois	Disease causing	Pathogène Score : 90	Pathogène Score :0.963
Patient 4	LMNA p.Arg582Leu	N.R	N.R	N.R	Disease causing	Pathogène Score : 96	Pathogène Score :0.988

Tableau 9 : Prédiction des différents logiciels d'analyse bio-informatique pour les différentes mutations du gène LMNA

N.R : Non Rapporté

B. Caractérisation des anomalies nucléaires

Il n'a pas été possible d'obtenir un prélèvement de fibroblastes pour le patient 2. Les anomalies nucléaires observées dans les fibroblastes des patients 3 et 4 mutés dans LMNA respectivement p.Gly631Asp et p.Arg582Leu, sont caractérisées par immunofluorescence après marquage avec un anticorps anti-lamine A. Les anomalies nucléaires principalement observées sont de taille, de forme et de répartition de la lamine A. Nous pouvons observer également des hernies de matériel nucléaire dans le cytoplasme, anomalie nucléaire observée typiquement dans la progéria.

Les anomalies nucléaires sont augmentées significativement dans les fibroblastes possédant la mutation LMNA comparés aux fibroblastes contrôle (**Figure 23**).

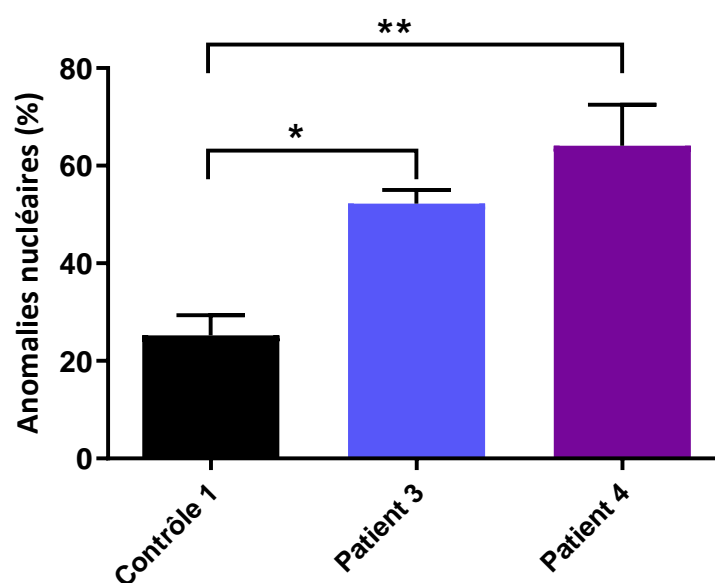


Figure 23 : Pourcentage des anomalies nucléaires sur les fibroblastes de patients et contrôle.

- Patient 3 : $n=4$ ($p=0.0286$)
- Patient 4 : $n=8$ ($p=0.004$)

Significativité : * $p<0.05$; ** $p<0.01$

C. Transfection transitoire de plasmides

Nous avons tenté de reproduire les anomalies nucléaires observées dans les cellules de patients en exprimant une protéine prélamine A mutée dans des cellules contrôle par transfection transitoire d'un plasmide contenant le cDNA prélamine.

La transfection transitoire est réalisée sur des fibroblastes contrôle, réputés sains, provenant de l'institut Coriell. Les fibroblastes sont transfectés avec 4 plasmides différents. Un plasmide codant pour une prélamine A sauvage ne présentant aucune mutation et servant de témoin négatif. Les 3 autres plasmides possèdent un ADNc codant pour une prélamine A comportant respectivement les 3 mutations identifiées chez les patients atteints de syndrome métabolique. Les plasmides sont testés à deux concentrations différentes : 250 et 500 ng. Le plasmide transfecté contenant la prélamine A sauvage ne doit pas entraîner un taux d'anomalies nucléaires des cellules transfectées supérieur à ce qui est connu (Bonello-Palot et al. 2014). En réalité, le taux d'expression de la prélamine A sauvage est assez élevé car le plasmide comporte un promoteur fort (pCMV) induisant une forte expression de prélamine A qui s'ajoute à la prélamine A intrinsèque. Cette surexpression du transgène entraîne une légère augmentation des anomalies nucléaires par accumulation de prélamine A car les capacités de maturation de la prélamine A en lamine A sont dépassées. Toutefois, l'augmentation de ces anomalies reste modérée et bien inférieure à celle observée avec les plasmides portant les mutations.

Le taux de transfection obtenu après 48 heures d'incubation est estimé entre 10 et 20%. Les expériences sont réitérées au minimum 5 fois.

Les plasmides contenant les mutations p.Gly411Asp et p.Gly631Asp ont été transfectés sur deux types cellulaires : cellules endothéliales et fibroblastes, la mutation p.Arg582Leu uniquement dans des fibroblastes. Les résultats montrent pour les deux types cellulaires une

augmentation significative du nombre d'anomalies nucléaires observées dans les cellules transfectées pour les 3 mutations (Figure 24 et 25).

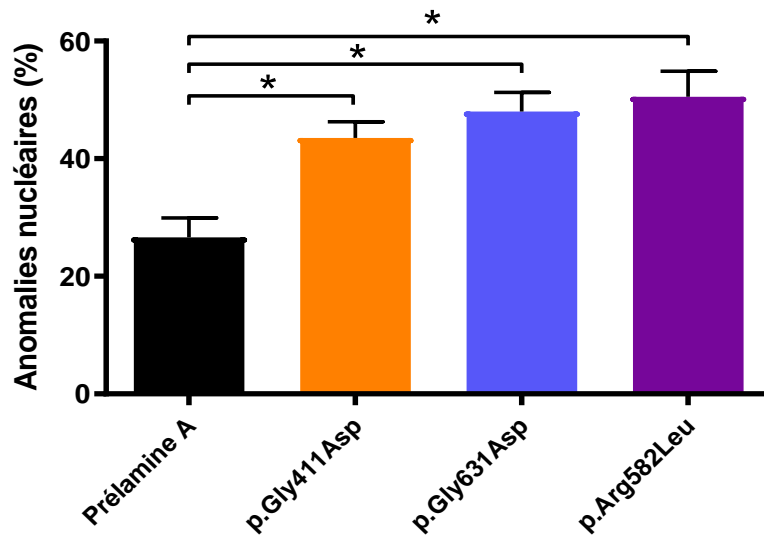


Figure 25 : Pourcentage d'anomalies nucléaires après transfection transitoire de plasmides exprimant une prélamine A sauvage ou mutée dans des fibroblastes (n=5).

Significativité : * $p < 0.05$

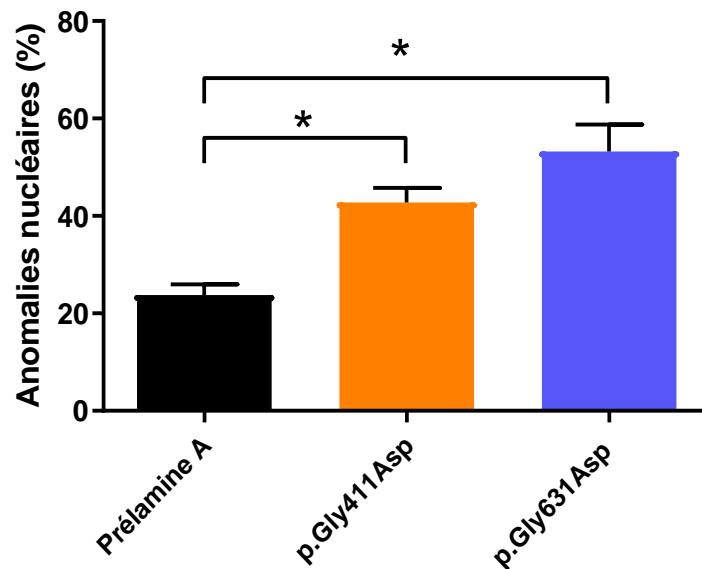


Figure 24 : Pourcentage d'anomalies nucléaires après transfection transitoire de plasmides exprimant une prélamine A sauvage ou mutée dans des cellules endothéliales (n=4).

Significativité : * $p < 0.05$

D. Modulation de l'expression de la lamine A par transfection d'ARN interférent

Dans le but de corriger les anomalies nucléaires causées par les différentes mutations du gène LMNA identifiées chez les patients, nous avons utilisé un siRNA anti-lamine A. L'analyse des résultats de Western Blot montre une diminution significative de production de lamine A dans les fibroblastes traités avec le siRNA anti-lamine (Figure 26). La diminution est évaluée entre 30 et 40%. L'effet du siRNA sur la morphologie nucléaire est alors évalué et comparé d'une part à l'effet d'un siRNA « scrambled » n'ayant aucun effet sur les transcrits produits par la cellule et d'autre part à des cellules ne subissant aucun traitement par siRNA.

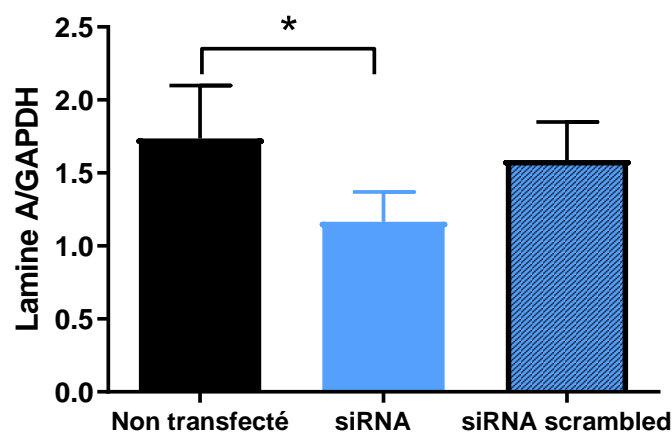


Figure 26 : Quantification par Western Blot de la quantité de lamine A traduite après traitement par siRNAs sur les fibroblastes du patient 3 (n=4).

Significativité : * $p < 0.05$

En immunofluorescence, les fibroblastes sont marqués par un anticorps anti-lamine A et par DAPI. Après transfection, les fibroblastes mutés traités par siRNA montrent une diminution significative du taux d'anomalies nucléaires (* $p < 0.05$) (**Figure 27**).

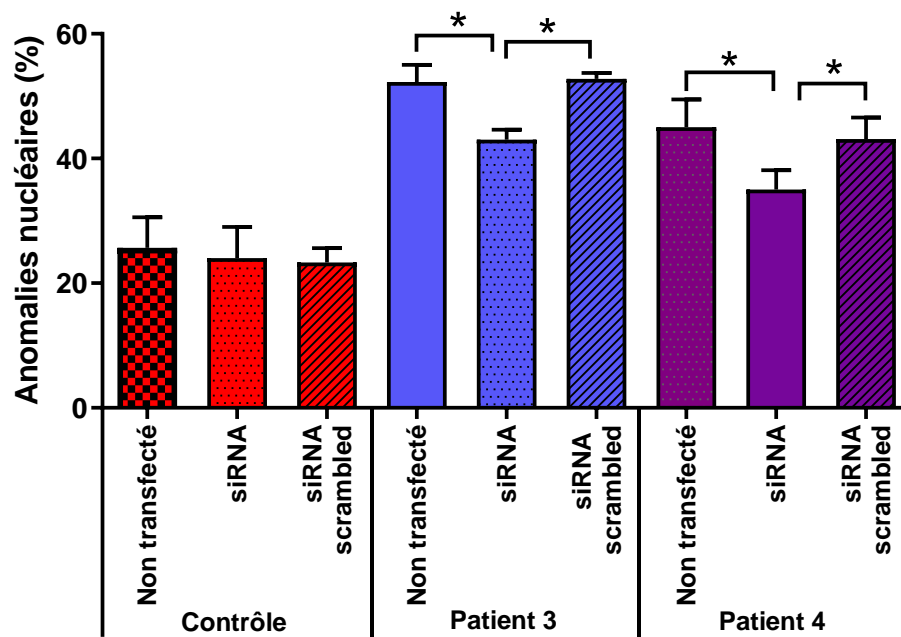


Figure 27 : Pourcentage d'anomalies nucléaires observées en immunofluorescence après traitement par siRNAs (n=4).

*Significativité : * $p < 0.05$*

E. Etude de la prolifération cellulaire et test de sénescence

1. Temps de doublement de la population

La prolifération cellulaire est évaluée par temps de doublement de la population. L'expérience consiste à mesurer la capacité des cellules à proliférer entre les passages P10 et P25.

Nous constatons que la capacité des cellules contrôle à proliférer reste stable entre les passages P10 et P20 alors que les fibroblastes portant la mutation LMNA p.Gly631Asp et p.Arg582Leu ont un taux de prolifération cellulaire significativement diminué (Test ANOVA, $p < 0.0001$)

(Figure 28).

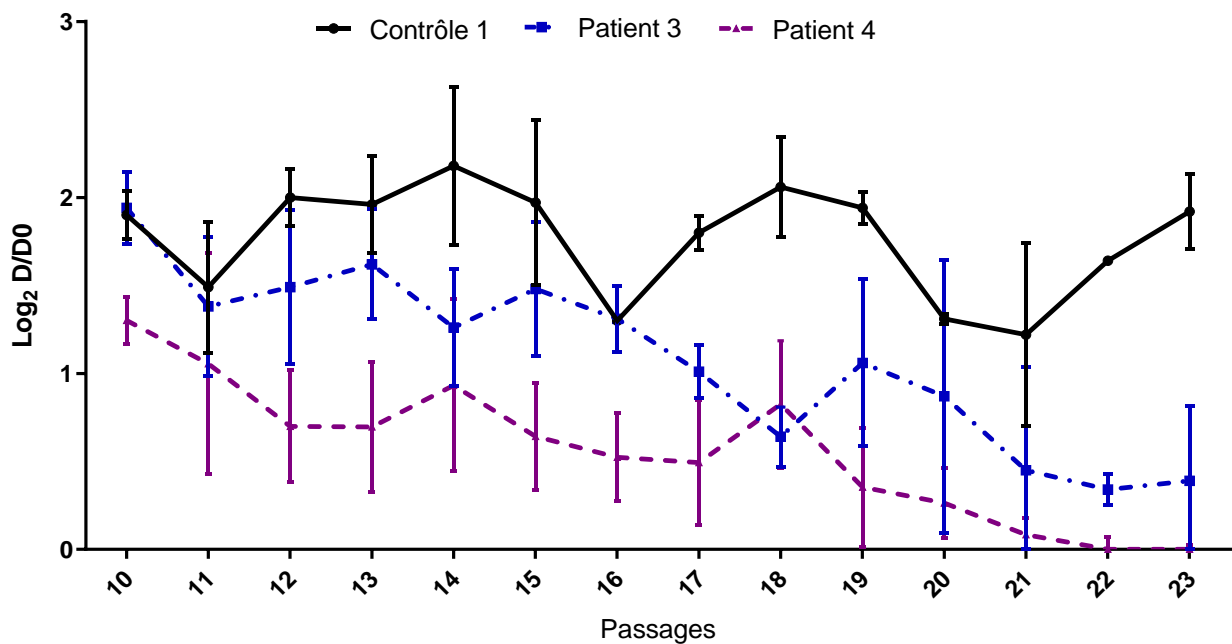


Figure 28 : Temps de doublement de population mesuré sur les fibroblastes contrôle et les fibroblastes portant une mutation du gène LMNA (n=3).

2. Incorporation du BrdU

Nous observons une diminution significative de la différence d'absorbance dans les fibroblastes mutés à un même passage (passage 16) ($p=0.0386$ et $p=0.0043$). Les fibroblastes mutés incorporent significativement moins de BrdU ce qui traduit une diminution significative du taux de réplication cellulaire (**Figure 29**).

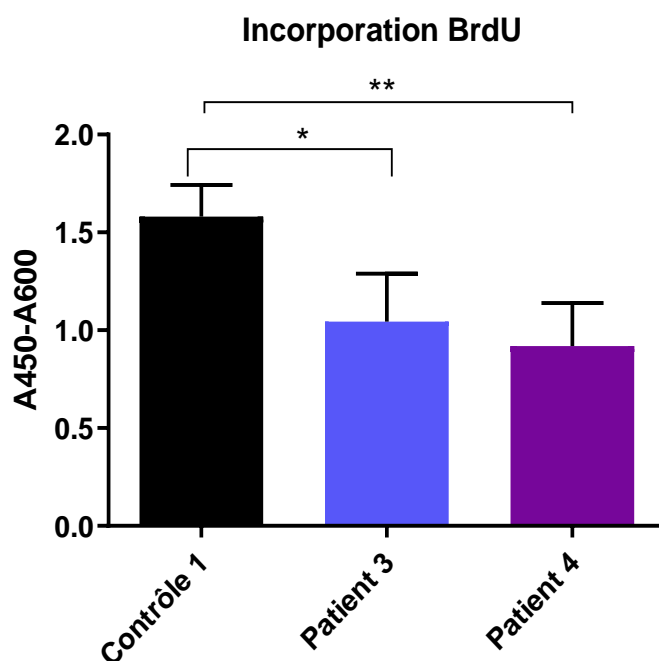


Figure 29 : Mesure de l'incorporation du BrdU dans les fibroblastes témoins (n=5) et les fibroblastes mutés LMNA.

- *Patient 3 : n=3*
- *Patient 4 : n=6*

*Significativité : * $p<0.05$; ** $p<0.001$*

3. Essai β -galactosidase

Nous constatons, à passage identique, une augmentation significative de la luminescence des fibroblastes mutés comparés aux fibroblastes contrôle. Ce résultat montre la présence d'une sénescence accélérée chez les fibroblastes de patients comparés à des fibroblastes témoins.

(Figure 30).

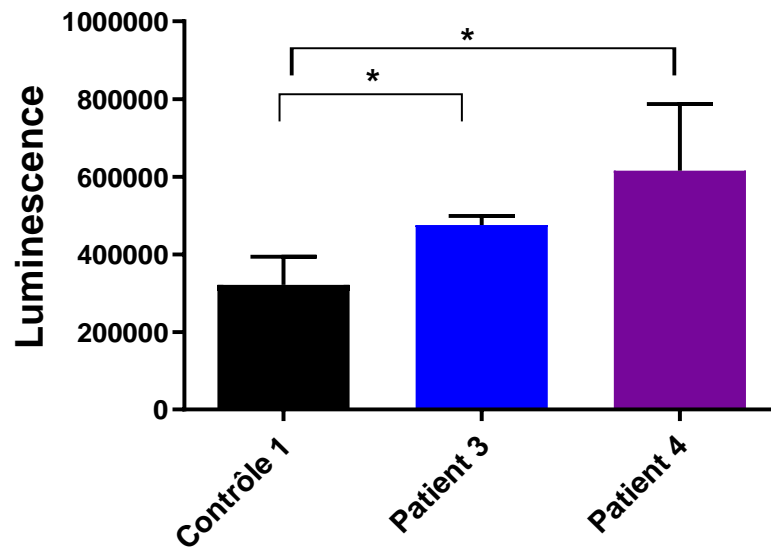


Figure 30 : Mesure de l'activité β -galactosidase sur les fibroblastes contrôles et les fibroblastes mutés LMNA (n=5).

*Significativité : * $p < 0.05$*

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la production de β -galactosidase en présence d'un siRNA anti-lamine. Après transfection par siRNA, la production de β -galactosidase redevient équivalente à la production de β -galactosidase observée chez les fibroblastes témoins traités ou non traités par siRNA uniquement pour le patient 3. Ce résultat s'avère non significatif pour le patient 4 ce qui suggère que pour cette mutation, le mécanisme pathologique ne repose pas entièrement sur l'accumulation de prélamine A muté. Les fibroblastes mutés présentent une sénescence significativement augmentée comparés aux fibroblastes contrôle. Cette sénescence n'est pas systématiquement prévenue par un traitement par ARN interférence contre le transcrit LMNA (Figure 31).

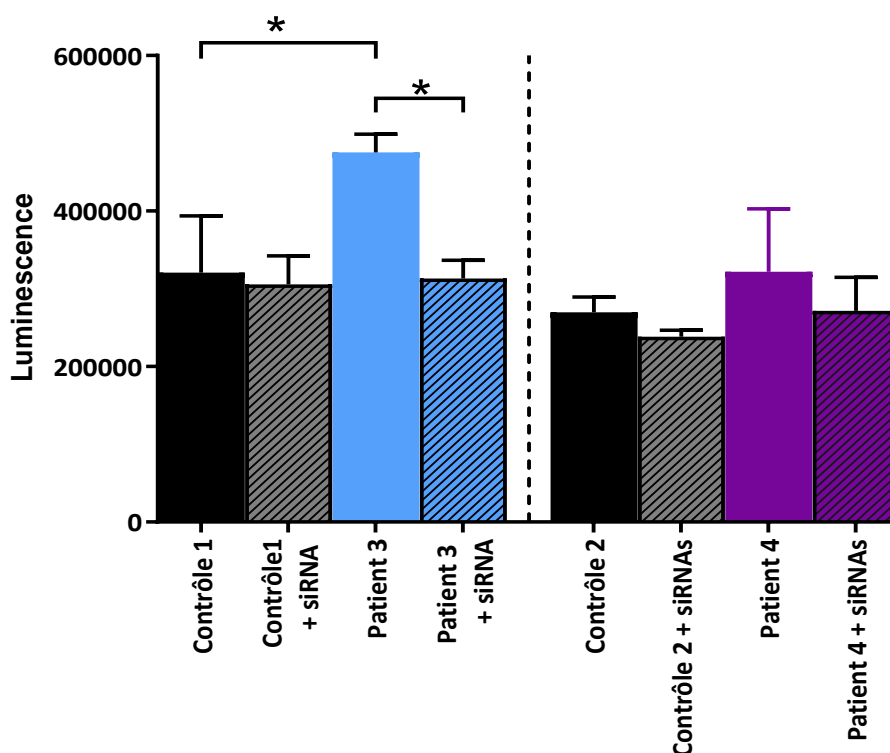


Figure 31 : Production de β -galactosidase mesurée sur les fibroblastes contrôles et des patient 3 et 4 non traités ou traités par siRNAs (n=5)

- Patient 3 : n=5
- Patient 4 : n=4

Significativité : * $p < 0.05$

IV. Etude des patients sans mutation identifiée

Cinq des patients étudiés présentent des anomalies de la morphologie nucléaire mais aucune mutation identifiée dans la lamine A ou dans les protéines responsables de sa maturation. Nous avons donc cherché à savoir si les cellules de ces patients présentaient aussi une sénescence accélérée et si les anomalies observées étaient dues à un mécanisme faisant indirectement intervenir la lamine A.

A. Tests de prolifération cellulaire et sénescence

1. Temps de doublement de population

La capacité de prolifération cellulaire est mesurée par temps de doublement de population. Les fibroblastes de patients sont comparés à un contrôle sain. Les fibroblastes de patients présentent une diminution significative du temps de doublement de population entre les passages P10 et P20 comparé à la culture primaire contrôle. La capacité de prolifération des cellules de patients décroît progressivement. Cette décroissance s'accélère à partir de P16 avec un taux de prolifération inférieur à 0.5 à partir de P20 marquant une capacité de prolifération cellulaire effondrée. Cette expérience montre que les cellules de patients ont une réplication cellulaire altérée (**Figure 32**).

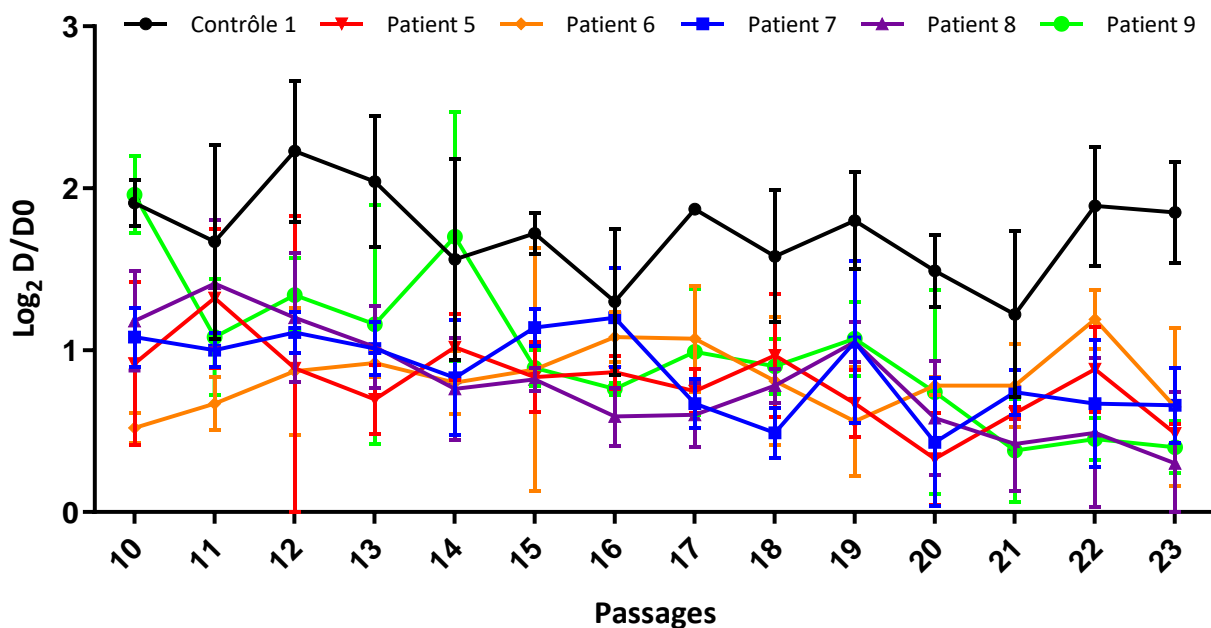


Figure 32 : Temps de doublement de population mesuré dans les fibroblastes des patients sans aucune mutation identifiée (n=3)

2. Incorporation de BrdU

Les fibroblastes de patients présentent une diminution significative de la différence d'absorbance comparé aux fibroblastes contrôle. Cette diminution traduit une diminution de l'incorporation de BrdU, révélant un défaut de la réplication cellulaire chez les fibroblastes de patients par rapport aux cellules témoin (**Figure 33**).

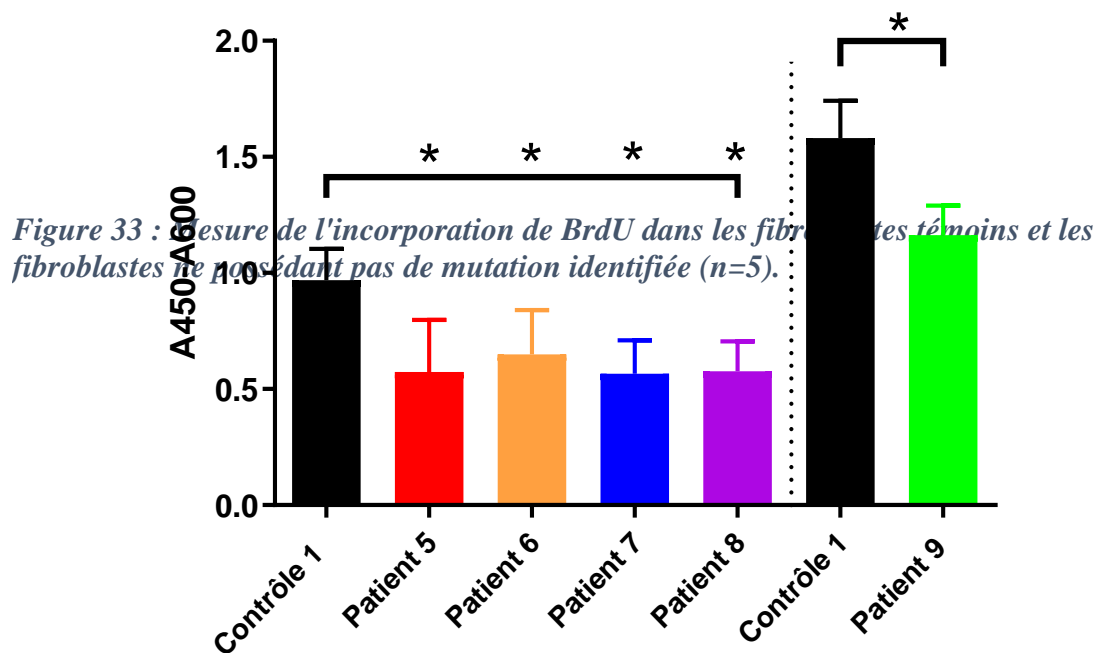


Figure 33 : Mesure de l'incorporation de BrdU dans les fibroblastes témoins et les fibroblastes ne possédant pas de mutation identifiée (n=5).

Significativité : * $p < 0.05$

3. Test à la β -galactosidase

La production de β -galactosidase a été mesurée sur les fibroblastes des patients pour déterminer le taux de sénescence des cellules. Les résultats obtenus sur les différentes cultures primaires de fibroblastes montrent une augmentation significative de la luminescence des cellules de patients par rapport au témoin. Cette augmentation de luminescence correspond à une augmentation de la production de β -galactosidase qui traduit une sénescence accrue chez les fibroblastes de patients comparés aux fibroblastes contrôles. Les expériences ont été réalisées à passage élevé (P20) pour tous les échantillons (**Figure 34**).

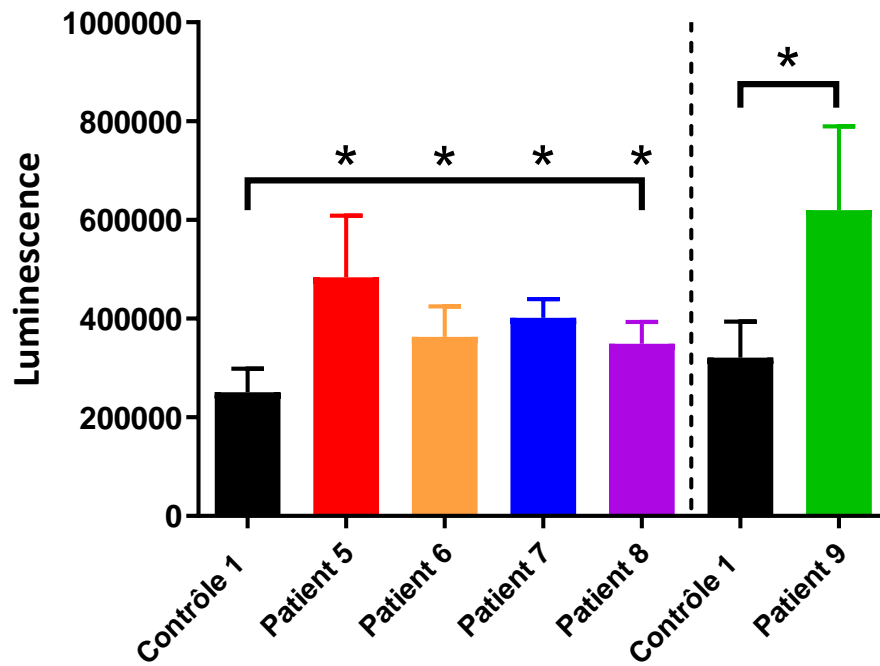


Figure 34 : Production de bêta-galactosidase mesurée sur les fibroblastes contrôle et des patients avec aucune mutation identifiée (n=5)

Significativité : * $p < 0.05$

B. Traitement par ARN interférent anti lamine A

Le traitement par un siRNA anti lamine A dans les fibroblastes de patients vise à diminuer la quantité de lamine A traduite. Nous cherchons à déterminer chez les patients n'ayant aucune mutation identifiée, si les anomalies nucléaires et la sénescence cellulaire sont dues à un mécanisme faisant intervenir la lamine A dans la cellule. Le siRNA est transfecté de façon transitoire pendant 48 heures dans des fibroblastes. Après 48 heures, nous mesurons par luminescence la production de β -galactosidase. Les patients 5, 6, 7 et 8 ne présentent pas de différence significative et ne montrent pas de diminution de production de β -galactosidase (**Figure 35**).

Dans le cas contraire, pour le patient 9, l'effet du siRNA anti lamine A sur la production de β -galactosidase montre un résultat similaire aux résultats obtenus pour les fibroblastes mutés *LMNA* et *ZMPSTE24*. Lorsqu'ils sont traités par siRNAs anti lamine A, les fibroblastes du patient 9 exhibent une luminescence équivalente aux fibroblastes contrôle traités et non traités. Le résultat pour le patient 9 témoigne ainsi d'une efficacité du traitement sur la sénescence cellulaire (**Figure 35**) et suggère que pour ce patient au moins, la lamine A ou la prélamine A, sont fortement impliquées dans le mécanisme pathologique. Toutefois, il fut mentionné que les cellules du patient 9 ont été traité dans une série d'expériences différentes par rapport aux patients sans mutation identifiée.

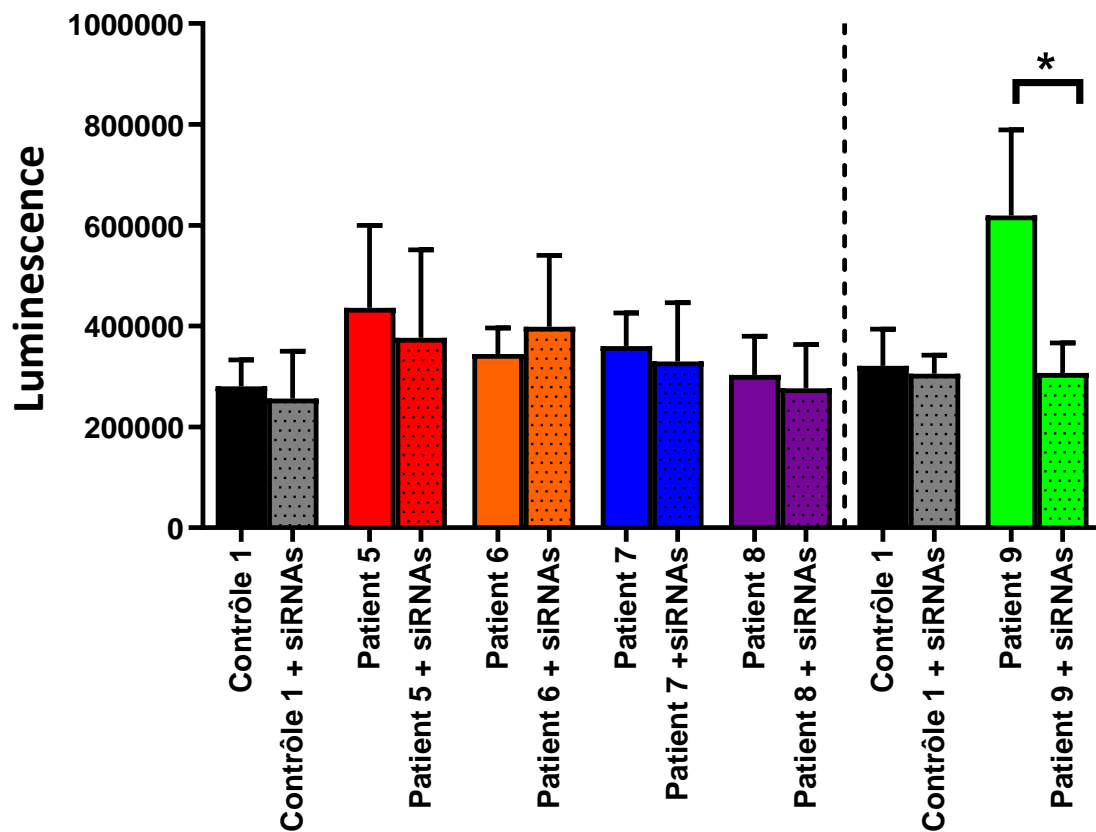


Figure 35 : Production de β -galactosidase mesurée sur les fibroblastes contrôles et sur les fibroblastes des patients 5, 6, 7, 8 et 9 traités ou non traités par siRNAs.

- Patient 5, 6, 7, 8 : n=8
- Patient 9 : n=6

Significativité : * $p < 0.05$

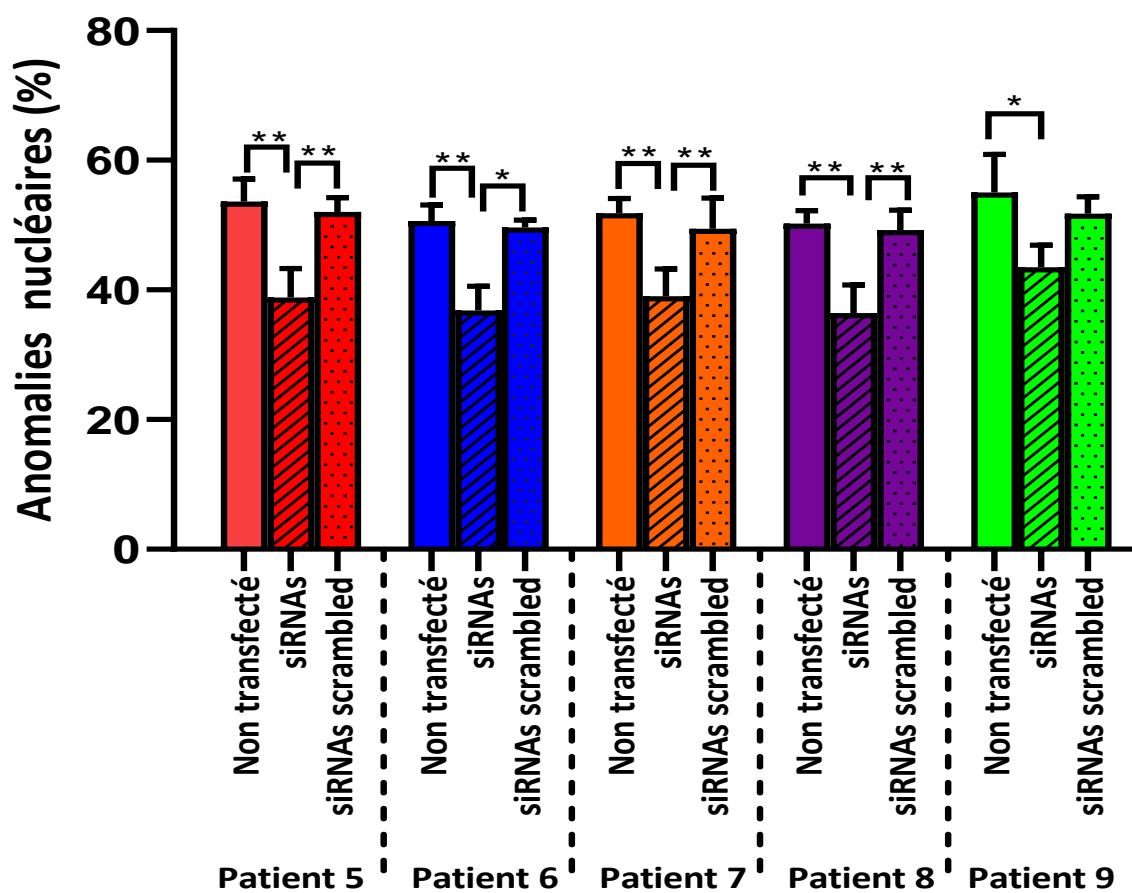


Figure 36 : Pourcentage d'anomalies nucléaires observées en immunofluorescence après traitement par siRNAs (n=5)

Significativité : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

C. Séquençage haut-débit

L'étude *in vitro* des fibroblastes des patients sans mutation identifiée montre les mêmes anomalies cellulaires que celles observées chez les fibroblastes possédant soit une mutation du gène *LMNA*, soit une mutation du gène *ZMPSTE24*. Nous avons émis l'hypothèse que ces anomalies sont dues à des anomalies d'une autre protéine de l'enveloppe nucléaire ou d'un partenaire protéique de la lamine A. Ce partenaire aurait un impact sur le rôle ou la localisation de la lamine A et entraînerait ainsi les défauts observés *in vitro*. Nous avons effectué un séquençage haut-débit sur des échantillons de sang de tous les patients de la cohorte. Nous avons utilisé 2 stratégies : un séquençage d'exome et une approche par un panel de 82 gènes impliqués dans l'obésité, le diabète, les lipodystrophies, le métabolisme lipidique, ou codant pour les partenaires protéiques de la lamine A.

Parmi les variants présents, nous avons retenu les variants rares (fréquence inférieure à 0.5% dans gnomAD), faux-sens (hypothèse : gain de fonction) et nous avons sélectionné les gènes présentant des variants chez au moins 2 des patients de la cohorte. Les résultats de séquençage d'exome et de panel de gènes nous ont permis d'identifier des variants hétérozygotes faux-sens prédits pathogènes par les différents logiciels d'analyse bio-informatique. Ces variants ont été identifiés dans les gènes de la famille nesprine et notamment dans les gènes *SYNE1* et *SYNE2*, protéines géantes jouant un rôle crucial dans les mécanismes de mécanotransduction. Nous avons mis en évidence deux variants situés respectivement dans les gènes *SUN2* et *SYNE3* impliqués dans le complexe LINC (**Tableau 12**). Nous avons également démontré Des expériences sont en cours pour documenter l'effet de ces variants sur l'intégrité du noyau et sur la sénescence.

	Gene	Mutation	snp138	UMD predictor	Polyphen	Mutation taster	gnomAD (%)
Patient 5	<i>SUN2</i>	c.1195G>A p.V399I	rs139004902	Polymorphisme	Probablement pathogène	Polymorphisme	$7,421.10^{-3}$
	<i>SYNE1</i>	c.23315G>A p.R7772Q	rs1388787771	Probablement pathogène	Probablement pathogène	Pathogène	$3,539.10^{-3}$
	<i>SYNE 1</i>	c.25856T>C p.L8619P	rs139834542	Probable polymorphisme	Probablement pathogène	Pathogène	$1,329.10^{-3}$
Patient 6	<i>SYNE1</i>	c.8686C>T p.R2896C	NA	Pathogène	Probablement pathogène	Pathogène	$3,218.10^{-5}$
Patient 7	<i>SYNE 1</i>	c.1141G>A p.D381N	rs146366996	Probable polymorphisme	Probablement pathogène	Polymorphisme	$1,186.10^{-3}$
Patient 8	<i>SYNE 2</i>	c.280A>G p.I94V	rs146748294	Probable polymorphisme	Probablement pathogène	Pathogène	$7,857.10^{-4}$
Patient 9	<i>SYNE 3</i>	c.2866G>T p.A956S	rs150752116	NE	Bénin	Pathogène	$3,677.10^{-4}$

Tableau 10 : Variants retrouvés en NGS chez les patients sans aucune mutations identifiées dans les gènes *LMNA* et *ZMPSTE24*

NE : Non établi

Discussion

A. Mutation ZMPSTE24

Dans cette partie, nous rapportons le phénotype détaillé d'un patient présentant un syndrome métabolique associé à une mutation hétérozygote faux-sens du gène *ZMPSTE24* ainsi qu'une exploration du phénotype cellulaire associé ZMPSTE24 (Galant et al. 2016). Jusqu'à présent, les mutations de la protéine ZMPSTE24 ont été associées à des syndromes progéroïdes comme la dysplasie acro-mandibulaire de type B et la dermatopathie restrictive (Cassini et al. 2018). Ces deux pathologies sont considérées comme des laminopathies car elles sont liées à une diminution voire une abolition de l'activité protéase de ZMPSTE24 induisant une accumulation de prélamine A carboxyméthylée et farnésylée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, principale responsable de la pathologie (Claire Laure Navarro et al. 2014). La sévérité de l'effet des mutations *ZMPSTE24* est directement corrélée au degré d'accumulation de prélamine A farnésylée dans les cellules et à la sévérité du phénotype clinique (Gordon et al. 2014; Worman et al. 2009).

La protéine ZMPSTE24 comporte 7 domaines transmembranaires qui l'insèrent dans la membrane du réticulum endoplasmique. La protéine est très conservée chez les eucaryotes, des levures aux mammifères. Les études de cristallographie 3D ont permis d'élucider sa structure et de mettre en évidence une classe de protéases particulière (Quigley et al. 2013). ZMPSTE24 contient une cavité avec un accès situé latéralement permettant probablement l'insertion de l'extrémité C-terminale de la prélamine A. La cavité contient un motif consensus HEXXH coordonnant la fixation d'un ion Zinc et responsable de l'activité catalytique de l'enzyme. Le motif fait face à l'intérieur de la chambre et rend possible la reconnaissance de la séquence de clivage située sur la prélamine A.

Une équipe a montré *in vitro* que la mutation décrite chez le patient 1 diminuait l'activité protéolytique de ZMPSTE24 à 6% de l'activité normale (Barrowman et al. 2012). La mutation

ZMPSTE24 : p.Leu438Phe a donc un effet perte de fonction mais cet effet devrait être compensé par l'allèle sauvage puisque le patient est hétérozygote.

Afin de déterminer si une mutation hétérozygote perte de fonction pouvait produire un phénotype de syndrome métabolique, une enquête a été réalisée sur les parents et les apparentés au premier et deuxième degré de nouveaux-nés portant la mutation homozygote *ZMPSTE24* : c.1085_1086insT (mutation perte de fonction par décalage du cadre de lecture) atteints de dermatopathie restrictive (OMIM #275210). Aucun des 4 apparentés interrogés, porteur hétérozygote de la mutation perte de fonction ne présente de diabète de type 2, d'hypertriglycémie ou de lipodystrophie. La perte de fonction complète d'un allèle n'entraînerait donc aucun effet phénotypique. Ceci suggère donc à contrario que la mutation *ZMPSTE24* : p.Leu438Phe exerce un possible effet dominant négatif responsable du phénotype observé chez notre patient hétérozygote. Les études de cristallographie 3D permettent d'établir qu'il existe un domaine transmembranaire, proche du motif consensus HEXXH. D'après les données cristallographiques, la mutation *ZMPSTE24* : p.Leu438Phe serait située dans ce domaine. Elle pourrait soit empêcher le clivage correct de la prélamine A dans la chambre où se situe l'activité enzymatique de *ZMPSTE24*, soit séquestrer la prélamine dans ce motif, soit diminuer son turn-over.

Une étude a effectué un classement des mutations du gène *ZMPSTE24* recensées dans la littérature (Spear et al. 2018). Le résultat définit 3 classes de mutations : celles de la classe I affectant principalement la stabilité de la protéine, celles de la classe II affectant principalement l'activité catalytique de la protéine et celles de la classe III affectant à la fois la stabilité et l'activité catalytique. Le variant *ZMPSTE24* : p.Leu438Phe a une activité catalytique de 57.2% et un taux d'expression de 67.9% comparé à l'enzyme sauvage. L'étude a classé la mutation *ZMPSTE24* p.Leu438Phe dans la classe III, affectant ainsi l'activité catalytique et la stabilité de *ZMPSTE24*. En comparaison, la mutation hétérozygote *ZMPSTE24* : p.Leu462Arg

responsable de dermatopathie restrictive se révèle être la plus sévère avec une activité catalytique de 6.5% et un taux d'expression de 29.7%. Néanmoins, la mutation classique responsable de dermatopathie restrictive *ZMPSTE24* : c.1085_1086insT n'a pas été testée.

Au niveau moléculaire, les lipodystrophies d'origine génétique sont liées à des défauts de différenciation cellulaire, de maturation du tissu adipeux ou de protéines impliquées dans le vieillissement accéléré (Hussain et Garg 2016). Le lien entre la lipodystrophie partielle et la sénescence cellulaire a été mis en évidence pour des mutations du gène *WRN* codant pour une hélicase impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que dans des mutations du gène *LMNA*. L'effet des mutations du gène *LMNA* entraînant le syndrome de Dunnigan est expliqué au niveau de la cellule par l'altération de l'architecture de l'enveloppe nucléaire causant ainsi une détérioration de la structure nucléaire des adipocytes menant à une mort cellulaire prématurée (Oshima, Sidorova, et Monnat 2017; Ahmed et al. 2017; Vigouroux et al. 2000a).

Contrairement aux patients atteints de lipodystrophie partielle familiale de type 2 associée à des mutations du gène *LMNA*, le patient muté *ZMPSTE24* ne montre pas de lipoatrophie des membres inférieurs et présente une hyperleptinémie au lieu d'un taux effondré en leptine. Il présente donc un tableau plus proche du syndrome métabolique que de la lipodystrophie familiale partielle d'origine génétique.

Les expériences *in vitro* effectuées sur les fibroblastes du patient révèlent une diminution de la prolifération et de la réplication cellulaire équivalente à celle observée sur des fibroblastes portant la mutation du gène *LMNA* entraînant un syndrome de Dunnigan. L'impact des mutations du gène *LMNA* sur la prélamine A a été montré dans de nombreuses études. La prélamine A mutée qui s'accumule lie SREBP1 à la périphérie du noyau et séquestre le pool de SREBP1 qui n'est plus disponible pour activer le facteur de transcription PPAR γ nécessaire à la différenciation des préadipocytes blancs (Capanni et al. 2005). Dans le cas de la mutation

ZMPSTE24 : p.Leu438Phe, le mécanisme implique d'une part une accumulation de la prélamine A due à la diminution de l'activité de la protéase *ZMPSTE24* mais aussi probablement un effet négatif de la protéine mutée sur la version non mutée de *ZMPSTE24*.

La limite de cette description réside dans le fait que l'étude familiale n'a pas été possible et que donc aucun autre cas n'a pu être formellement diagnostiqué dans la famille du patient initial.

Néanmoins, la mutation de la protéine *ZMPSTE24* entraînant ce phénotype a été mis en cause chez 2 patients n'ayant aucun lien de parenté. Le phénotype observé est moins sévère dans le second cas mais entraîne des désordres métaboliques déjà observés chez notre patient. Cette mutation reste très rare ce qui pourrait être due à une forte pression de sélection et une conservation importante de l'acide aminé. Sur les bases de données agrégée d'exome, ce variant n'est observé que 22 fois dans une population asiatique de l'est portant la fréquence globale à 7.7×10^{-5} . Les deux patients étudiés ne sont pas originaires de ce bassin de population (Asiatique du sud et Européen non finnois).

B. Mutations LMNA

Les patients décrits dans cette étude présentent une mutation de la lamine A associée à un phénotype de syndrome métabolique sévère avec un diabète de type 2, une hypertriglycéridémie, une stéatose hépatique et une anomalie de répartition du tissu adipeux. Ils présentent par ailleurs un niveau de sénescence cellulaire élevé, caractérisé par un taux d'anomalies nucléaires élevé (>30%), une capacité de prolifération diminuée et un taux de réplication diminué. La surexpression de cDNA codant pour la prélamine A mutée dans des fibroblastes sains permet de reproduire les anomalies nucléaires observées *in vitro* sur des cellules de patients. Par ailleurs, le taux d'anomalies nucléaires observées est corrigé par transfection d'un siRNA anti-lamine A, confirmant le rôle de l'accumulation de la forme mutée de la prélamine A dans l'apparition des anomalies nucléaires.

Les mutations du gène *LMNA* peuvent entraîner des laminopathies tissu-spécifiques du tissu adipeux (Jeru et al. 2017). La lipodystrophie partielle familiale de type 2 est caractérisée par des désordres métaboliques et une répartition anormale du tissu adipeux survenant entre 20 et 30 ans. Il existe un hot-spot mutationnel situé sur le codon 482 impliqué dans plus de 80% des cas du syndrome de Dunnigan (Dunnigan et al. 1974; Robert A. Hegele et al. 2000; Vigouroux et al. 2000a). Les fibroblastes issus de patients atteints d'une lipodystrophie partielle familiale de type 2 expriment un phénotype comparable aux cellules des patients avec une laminopathie plus sévère (sénescence prématurée, production d'espèces réactives de l'oxygène et dysfonction mitochondriale) (Worman et Bonne 2007) avec en particulier un taux important d'anomalies nucléaires, ce qui suggère une modification de la composition de la lamina nucléaire (Guénantin et al. 2014). De plus, d'autres études montrent une inhibition de la différenciation cellulaire des pré-adipocytes en adipocytes (Boguslavsky, Stewart, et Worman 2006) soulignant le rôle des mutations du gène *LMNA* dans l'altération de l'adipogenèse.

Nous rapportons chez deux patients portant une mutation du gène *LMNA* une altération de la prolifération et de la réplication cellulaire qui traduit une augmentation de la sénescence cellulaire. L'étude *in vitro* sur les fibroblastes montre pour ces deux mutations des caractéristiques typiques des laminopathies, mais associées à un phénotype clinique plus modéré et correspondant plus à un syndrome métabolique sévère qu'à une FPLD typique. En particulier, il n'existe pas de lipoatrophie des membres inférieurs, ce qui est habituellement observé dans les FPLD et le taux de leptine reste normal ou même augmenté alors qu'il est effondré dans la FPLD (Vigouroux et al. 2000b; Jeru et al. 2017).

Les mutations mises en évidence dans les lipodystrophies atypiques sont réparties sur l'ensemble du transcrit *LMNA* reflétant une grande hétérogénéité allélique. Néanmoins, la majorité des mutations sont localisées dans le domaine C-terminal de la protéine et dans le domaine de liaison aux immunoglobulines (Guillín-Amarelle et al. 2018). Les mutations *LMNA* : p.Arg582Leu et *LMNA* : p.Gly631Asp touchent uniquement la protéine lamine A puisqu'elles sont situées après le site d'épissage alternatif de l'exon 10 et ne concernent pas l'isoforme lamine C. Le phénotype clinique est plus sévère chez le patient portant la mutation *LMNA* : p.Gly631Asp, probablement parce qu'il s'agit d'un patient de sexe féminin. En effet, les femmes sont plus sévèrement atteintes que les hommes ce qui suggère que les individus de sexe masculin pourraient être sous-diagnostiqués car présentent des formes plus modérées de syndrome métabolique. Il serait indiqué d'étendre la recherche de mutations à des formes cliniques moins sévères ou modérées présentant uniquement des désordres métaboliques accompagnés d'anomalies de répartition des graisses mais cela pourrait représenter un nombre d'échantillons très important à tester.

Récemment, une étude a mis en évidence dans une famille, une mutation du gène *LMNA* p.Arg582Cys à l'état hétérozygote chez certains membres et homozygote chez d'autres. Cette mutation située sur le même résidu que la mutation portée par le patient 3 est associée quel que

soit le statut homozygote ou hétérozygote, à une lipodystrophie atypique. Les 3 femmes portant la mutation à l'état homozygote présentent une lipodystrophie atypique sévère associée à des désordres métaboliques importants (Montenegro et al. 2018). Un homme, membre de cette famille et porteur de la mutation à l'état hétérozygote présente une lipodystrophie plus modérée comparable à celui présenté par une patiente porteuse hétérozygote pour la même mutation décrite dans une étude précédente (Mory et al. 2012) et comparable également au patient 3 présenté dans ce travail. Différentes substitutions de cet acide aminé entraînent donc des phénotypes similaires de lipodystrophies atypiques.

Dans la littérature, seuls quelques cas ont jusqu'ici été rapportés associant un syndrome métabolique avec une mutation du gène *LMNA* (Ambonville et al. 2017; Dutour et al. 2011; Galant et al. 2016; Decaudain et al. 2007). Au regard de la prévalence du syndrome métabolique sur la planète, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe probablement un nombre non négligeable de patients présentant une mutation du gène *LMNA* mais que ces patients sont sous diagnostiqués

Une récente étude basée sur l'analyse de la fréquence des variants dans plusieurs bases de données révèle un grand nombre de variants *LMNA* dont certains selon les logiciels d'analyse bio-informatique, pourraient être impliqués dans une modification de la fonction ou de l'assemblage des lamines dans la lamina pouvant ainsi jouer un rôle dans la survenue de pathologies comme le diabète de type 2 (Florwick et al. 2017).

Une autre étude décrit une anticipation des complications métaboliques sur 3 générations de patients atteints de lipodystrophies et portant des mutations du gène *LMNA* (Jeru et al. 2017). Elle décrit une différence de 15 ans dans l'âge d'apparition de la lipodystrophie et l'hypertriglycémie entre la première et deuxième génération. Les auteurs constatent l'apparition de lipodystrophies chez tous les patients de la troisième génération avant l'âge de 18 ans (n=5). Le rôle des modifications récentes du régime alimentaire sur ce phénomène

d'anticipation n'est pas évalué. Cette étude met en avant l'importance du diagnostic génétique chez les apparentés pour les mutations du gène *LMNA* entraînant des lipodystrophies puisqu'un suivi clinique spécifique et thérapeutique peut être mis en place pour ces patients selon de nouvelles directives de 2016

En résumé, les différentes études *in vitro* réalisées sur ces mutations dans ce travail mettent en évidence le rôle de la lamine A mutée dans l'apparition des anomalies nucléaires et dans la sévérité du phénotype. Les cas de lipodystrophies atypiques associés à une mutation du gène *LMNA* montrent une grande hétérogénéité clinique. Cette variabilité peut s'accompagner d'un possible rôle de facteurs environnementaux et/ou de facteurs génétiques modificateurs difficile à explorer.

C. Patients sans mutations identifiées

Nous présentons les résultats de l'étude de la sénescence chez 5 patients présentant un syndrome métabolique associé à un taux d'anomalies nucléaires augmenté (Dutour et al. 2011). Les études *in vitro* montrent une altération de la prolifération et de la réplication cellulaire et une augmentation de la sénescence cellulaire, caractéristiques cellulaires communes aux laminopathies alors qu'aucune mutation n'a été retrouvée dans ce gène. Néanmoins, la capacité de prolifération cellulaire est moins altérée que chez les patients présentant des mutations hétérozygote faux-sens des gènes *LMNA* et/ou *ZMPSTE24*.

La transfection de siRNAs anti lamine A dans des fibroblastes de patients améliore cependant le taux d'anomalies nucléaires, suggérant que la désorganisation de la lamina nucléaire et les anomalies nucléaires pourraient être causées par l'altération de l'interaction de la lamine A avec l'un de ses partenaires. En effet, si la diminution de la production de prélamine A et donc de lamine A corrige les défauts de morphologie nucléaire, on peut supposer qu'un des constituants de l'enveloppe nucléaire en lien avec la lamine A porte une anomalie qui l'empêche d'interagir tout à fait normalement avec elle et entraîne donc ces anomalies. Toutefois, l'altération de la lamina paraît moins importante que dans les cas où la lamine A est directement atteinte, puisque le traitement par siRNAs ne permet pas dans la majorité des cas de corriger les tests de sénescence à la β -galactosidase, ni l'altération de la capacité de réplication (BrDU).

L'analyse par séquençage haut débit réalisée sur des gènes partenaires des lamines, des gènes du métabolisme lipidique, des gènes impliqués dans les pathologies du vieillissement accéléré et les syndromes lipodystrophiques a mis en évidence des variants candidats dans les gènes *SYNE1*, *SYNE2*. Ces gènes codent pour les protéines de la famille nesprine, respectivement pour nesprine 1, nesprine 2 et nesprine 3 (Rajgor et Shanahan 2013). Ces protéines sont des partenaires indirects des lamines. Les nesprines font partie du complexe LINC permettant le

lien entre le cytosquelette et le nucléosquelette (Horn 2014). Les nesprines, liées au cytosquelette, s'associent dans l'espace périnucléaire avec les protéines SUN connectées dans le noyau avec les lamines et d'autres protéines nucléaires ancrées dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (Horn et al. 2013).

Cette interaction entre le cytosquelette et le nucléosquelette est médiée par les protéines SUN et nesprines qui permettent la transmission de signaux mécaniques de la membrane plasmique et du cytoplasme au noyau (Nie et al. 2016). Le complexe LINC assure des rôles multiples permettant de réguler de nombreux phénomènes dans la cellule dont le positionnement du noyau et du centrosome, la migration du noyau, la mécanotransduction et la division cellulaire (Sosa et al. 2012; Horn 2014; Cartwright et Karakesisoglou 2014).

Les nesprines ont été impliquées en pathologie humaine. Les nesprines 1 et 2 sont associées respectivement avec la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss de type 4 (OMIM #612998) et 5 (OMIM #612999), pathologie qui peut aussi être causée par des mutations de la lamine A (G. Bonne et al. 1999; Koch et Holaska 2014). Les nesprines sont donc responsables de pathologies faisant partie du spectre des laminopathies tissu-spécifiques.

A ce jour, aucune mutation dans les protéines composant le complexe LINC n'a été associée avec un syndrome lipodystrophique ou cardio-métabolique. Néanmoins, une étude a démontré l'impact du complexe LINC dans l'adipogenèse et souligne le rôle crucial des différents types de lamines (Boguslavsky, Stewart, et Worman 2006). Ainsi, la dynamique de l'organisation de la lamina nucléaire module le cytosquelette et joue un rôle dans la différenciation cellulaire des adipocytes. Lors de la multiplication et la différenciation cellulaire du tissu adipeux, l'assemblage et le réassemblage de l'enveloppe nucléaire est un évènement crucial (Capanni et al. 2005). La réorganisation de l'enveloppe nucléaire est dépendante du pool de lamines. Les mutations de la lamine A entraînent une réorganisation anormale de la lamina nucléaire

(Verstraeten et al. 2011). L'organisation de l'enveloppe nucléaire et du cytosquelette dépend du complexe LINC.

Ces études suggèrent l'importance du lien entre le complexe LINC (protéines nesprines et SUN) et les lamines. Les mutations nesprines peuvent ainsi altérer la lamina nucléaire et le pool des lamines dans le tissu adipeux. Le rôle de ces mutations n'est pas encore élucidé mais pourrait se révéler un facteur génétique à l'origine de désordres du tissu adipeux.

Les nesprines sont des protéines géantes et sont très polymorphes. De nombreuses substitutions sont présentes d'un individu à l'autre, certaines fréquentes et d'autres plus rares. Parmi les plus rares, certaines de ces variations faux sens pourraient avoir un impact fonctionnel. Toute la difficulté est de repérer, la ou les mutations ayant un possible effet sur le fonctionnement normal de la protéine parmi l'ensemble des nombreuses variations qui sont, pour la plupart, silencieuses. L'étude des propriétés fonctionnelles des variants les plus rares mise en évidence chez les patients fera l'objet de projets futurs. Parmi les variants identifiés, il est nécessaire de leur imputer un rôle. Les premières pistes sont d'intégrer à l'aide de vecteurs viraux des mini-nesprines comportant, en une taille réduite, toutes les parties fonctionnelles de la protéine. Cette approche peut permettre de montrer par rapport à un témoin sain, l'impact des mutations sur la morphologie des noyaux et donc la lamina nucléaire et ses interactions avec la chromatine. Ainsi, il est également envisagé de déterminer dans les fibroblastes de ces patients s'il existe une altération de l'architecture des différentes protéines ancrées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire interagissant avec la chromatine et les différents types de lamines. La mise en évidence des bases moléculaires favorisant l'apparition d'un syndrome métabolique est primordiale pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies, pour pouvoir identifier les patients à risque. Néanmoins, la définition du syndrome métabolique reste clinique ne permettant pas d'apprécier l'importance de la génétique et d'autres facteurs environnementaux. Aujourd'hui, le terme de syndrome cardiométabolique regroupe un

ensemble de signes métaboliques (insulino-résistance, obésité et hypertension) s'aggravant en pathologies plus sévère au fil du temps dont le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et AVC. Cette définition met en avant l'importance de l'environnement associé à un fond génétique favorable.

Dans le cadre génétique, les mutations du gène *LMNA* associées à des anomalies du tissu adipeux sont un bon modèle pour étudier de nouvelles cibles d'intérêts. Les progrès effectués dans l'étude des laminopathies mettent en évidence de nouvelles voies de signalisation témoignant des dérèglements du tissu adipeux et des désordres métaboliques inhérents à ces pathologies. Les premières pistes thérapeutiques visaient à inhiber la farnésylation des prélamines. Ainsi, les traitements à base d'inhibiteur direct de la farnésyl transférase et/ou l'association de médicaments agissant en amont de cette voie (Pravastatine et Zolendronate) ne peuvent être considérés comme des traitements curatifs mais permettent une amélioration de certains signes cliniques de la Progeria de Hutchinson-Gilford, insuffisant face à la sévérité de la pathologie. D'autres pistes se basent sur des approches différentes visant soit à diminuer les niveaux de la lamine immature, soit à inhiber leur traduction (ARN interférence), soit à augmenter son élimination par autophagie (rapamycine). Ces pistes ne permettent pas encore de faire la lumière sur les mécanismes complexes de HGPS. Néanmoins, elles permettent d'obtenir des renseignements nécessaires pour le traitement des laminopathies tissu-spécifique. Par exemple, la rapamycine inhibe le complexe mTORC1 nécessaire à l'homéostasie du tissu adipeux via SREBP1. Un traitement curatif reste imaginable dans un futur proche néanmoins les travaux de recherche mettent en évidence le rôle de voies métaboliques permettant d'apprécier plus finement les relations entre les désordres métaboliques et le tissu adipeux ouvrant ces axes de recherche pour les pathologies associées au syndrome cardiométabolique.

Conclusion

Ce travail de thèse repose sur l'étude de patients atteints de syndrome métabolique présentant un taux élevé d'anomalies nucléaires. Les anomalies nucléaires sont caractéristiques des pathologies liées au vieillissement accéléré dont font partie les laminopathies. Causées par des mutations du gène *LMNA*, les laminopathies peuvent être associées à des pathologies spécifiques du tissu adipeux dont les formes les moins sévères présentent des similitudes avec le syndrome métabolique. Nous avons ainsi caractérisé *in vitro* la sénescence cellulaire chez 9 patients présentant un syndrome métabolique associé à un taux d'anomalies nucléaires de 30%. Dans cette étude, 3 de ces patients présentent une mutation hétérozygote faux-sens du gène *LMNA*, 1 patient présente une mutation faux-sens hétérozygote du gène *ZMPSTE24* et les 5 derniers patients ne présentent aucune mutation dans les gènes connus de lipodystrophie génétique ou de maladies avec vieillissement prématuré. L'évaluation de la sénescence par un panel d'expériences montre les mêmes caractéristiques pour les patients mutés *LMNA*, *ZMPSTE24* ou non mutés. Nous mettons en évidence *in vitro* une sénescence cellulaire accélérée, associée à des anomalies nucléaires chez des patients présentant initialement un syndrome métabolique. Nous observons que la sévérité du phénotype clinique est positivement corrélée à la sévérité du phénotype cellulaire dans le cadre des patients porteurs d'une mutation *LMNA*. De plus, nous décrivons pour la première fois une mutation du gène *ZMPSTE24* associée à un phénotype de syndrome métabolique associé à la présence d'une hypertrophie du tissu adipeux similaire à celle constatée chez les patients présentant un syndrome de Dunnigan. Ces travaux montrent l'importance de ces mutations dans la survenue des désordres métaboliques et dans les anomalies du tissu adipeux. Il permet de souligner le rôle important du processus de maturation post-traductionnelle de la prélamine A. L'impact de ces mutations est dépendant toutefois de facteurs environnementaux favorisant le syndrome métabolique. L'apparition de désordres métaboliques et d'anomalies du tissu adipeux dans les 3 premières décennies doivent indiquer une recherche de mutation dans les gènes de lipodystrophie partielle.

Ces travaux ont mis en évidence des résultats similaires chez des patients ne portant pas une mutation dans les gènes *LMNA* ou *ZMPSTE24*. Les cellules présentent une sénescence accélérée associée à des anomalies nucléaires. Les expériences par ARN interférence anti-lamine A montrent une correction des anomalies nucléaires soulignant l'implication indirecte des lamines A dans le mécanisme physiopathologique. Les mutations détectées par NGS sont situées dans des protéines impliquées dans les protéines du complexe LINC dont notamment les protéines nesprines. A ce jour, aucune mutation dans ces protéines a été associée à une pathologie du tissu adipeux. Ainsi, il est nécessaire de déterminer si les mutations identifiées sont responsables du phénotype cellulaire. Pour cela, une stratégie de transfection d'isoformes modifiées et plus courtes de protéines nesprines permettra d'étudier leur impact sur les noyaux des cellules.

Des tests rapides déterminant les défauts des cellules du patient permettraient d'apprécier la sévérité du phénotype anticipant les possibles désordres métaboliques. Dans cette optique, le dépistage de mutations potentiellement causales dans les gènes des laminopathies ou partenaires associé à des tests cellulaires permettrait une meilleure compréhension des pathologies spécifiques du tissu adipeux de phénotype discret.

Articles et Revues

I. Article: A heterozygous *ZMPSTE24* mutation associated with severe metabolic syndrome, ectopic fat accumulation, and dilated cardiomyopathy

Article

A Heterozygous ZMPSTE24 Mutation Associated with Severe Metabolic Syndrome, Ectopic Fat Accumulation, and Dilated Cardiomyopathy

Damien Galant¹, Bénédicte Gaborit^{2,3}, Camille Desgrouas^{1,4}, Ines Abdesselam^{2,5}, Monique Bernard⁵, Nicolas Levy^{1,6}, Françoise Merono¹, Catherine Coirault⁷, Patrice Roll^{1,8}, Arnaud Lagarde¹, Nathalie Bonello-Palot^{1,6}, Patrice Bourgeois^{1,6}, Anne Dutour^{2,3} and Catherine Badens^{1,6,*}

¹ Inserm UMR_S U910, Faculté de Médecine, Aix-Marseille Université, Marseille 13385, France; galant.damien@gmail.com (D.G.); camille.desgrouas@univ-amu.fr (C.D.); nicolas.levy@univ-amu.fr (N.L.); francoise.merono@univ-amu.fr (F.M.); patrice.roll@univ-amu.fr (P.R.); arnaud.lagarde@ap-hm.fr (A.L.); Nathalie.BONELLO@ap-hm.fr (N.B.-P.); Patrice.BOURGEOIS@ap-hm.fr (P.B.)

² Inserm U1062/Inra1260, Aix-Marseille Université, Marseille 13385, France; benedicte.gaborit@ap-hm.fr (B.G.); inesabdesselam@hotmail.com (I.A.); anne.dutour@ap-hm.fr (A.D.)

³ APHM, Endocrinology, Metabolic Diseases and Nutrition, Marseille 13385, France

⁴ Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille 13385, France

⁵ CNRS, CRMBM UMR 7339, Aix-Marseille Université, Marseille 13385, France; monique.bernard@univ-amu.fr

⁶ APHM, CHU de la Timone, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Marseille 13385, France

⁷ Institut de Myologie, UMR_S U974 INSERM-UPMC-CNRS-AIM, Paris 75013, France; c.coirault@institut-myologie.org

⁸ APHM, CHU de la Timone, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Marseille 13385, France

* Correspondence: catherine.badens@univ-amu.fr; Tel.: +33-491-32-49-25; Fax: +33-491-80-43-19

Academic Editor: Thomas Dechat

Received: 1 February 2016; Accepted: 18 April 2016; Published: 25 April 2016

Abstract: *ZMPSTE24* encodes the only metalloprotease, which transforms prelamin into mature lamin A. Up to now, mutations in *ZMPSTE24* have been linked to Restrictive Dermopathy (RD), Progeria or Mandibulo-Acral Dysplasia (MAD). We report here the phenotype of a patient referred for severe metabolic syndrome and cardiomyopathy, carrying a mutation in *ZMPSTE24*. The patient presented with a partial lipodystrophic syndrome associating hypertriglyceridemia, early onset type 2 diabetes, and android obesity with truncal and abdominal fat accumulation but without subcutaneous lipoatrophy. Other clinical features included acanthosis nigricans, liver steatosis, dilated cardiomyopathy, and high myocardial and hepatic triglycerides content. Mutated fibroblasts from the patient showed increased nuclear shape abnormalities and premature senescence as demonstrated by a decreased Population Doubling Level, an increased beta-galactosidase activity and a decreased BrdU incorporation rate. Reduced prelamin A expression by siRNA targeted toward *LMNA* transcripts resulted in decreased nuclear anomalies. We show here that a central obesity without subcutaneous lipoatrophy is associated with a laminopathy due to a heterozygous missense mutation in *ZMPSTE24*. Given the high prevalence of metabolic syndrome and android obesity in the general population, and in the absence of familial study, the causative link between mutation and phenotype cannot be formally established. Nevertheless, altered *lamina* architecture observed in mutated fibroblasts are responsible for premature cellular senescence and could contribute to the phenotype observed in this patient.

Keywords: metabolic syndrome; cardiomyopathy; *ZMPSTE24*; premature senescence; nuclear anomalies; laminopathy

1. Introduction

Nuclear envelope defects, and more specifically defects of the meshwork named *lamina*, which underlie the nuclear envelope (NE), result in various rare diseases with premature aging features. Lamins (A and B-type lamins) are the main constituents of the *lamina*, which provide shape and rigidity to the nucleus and play a critical role in gene expression. To be fully functional, the lamin A precursor protein named prelamins A, undergoes several steps of post-translational maturation ending in the cleavage of its farnesylated tail and resulting in mature lamin A. ZMPSTE24, a zinc metalloprotease, is the only enzyme able to perform this cleavage and so far, prelamins A is the only mammalian substrate identified for ZMPSTE24 [1]. Progeria, one of the most severe diseases with premature aging, is most commonly caused by a dominant mutation (c. 1824C > T) in *LMNA*, the gene encoding A-type lamins [2,3]. This mutation leads to an internal deletion of 50 amino acids and removes the ZMPSTE24 cleavage site within prelamins A. Consequently, the resulting mutant prelamins A (called progerin) cannot be cleaved and accumulates in cells, exerting a toxic effect by NE perturbation [4]. Familial Partial Lipodystrophy syndromes (FPL) also result from heterozygous mutations in lamin A, often producing maturation defects and prelamins A accumulation, although less drastic than in Progeria.

Because of the critical role of ZMPSTE24 during prelamins A maturation, null mutations in *ZMPSTE24* also result in prelamins A accumulation and produce diseases with premature ageing [5,6]. Prelamins A that accumulates because of decreased ZMPSTE24 activity, permanently retains its farnesylated tail, similarly to progerin, and is responsible for the same nuclear defects. The amount of prelamins A which remains uncleaved varies according to the type of ZMPSTE24 mutations and to the degree of enzyme activity reduction. The total absence of ZMPSTE24 results in the higher amount of prelamins A and to the most severe phenotype, the lethal neonatal Restrictive Dermopathy (RD) [7]. Other mutations allowing a residual activity are associated with less severe clinical phenotypes such as Mandibulo-Acral Dysplasia (MAD) [8]. Here we report detailed clinical phenotype and cellular investigations for a patient carrying a heterozygous missense mutation in *ZMPSTE24* and referred for common central obesity with metabolic syndrome (MS). This patient was reported initially in a cohort of several patients with severe metabolic syndrome and cell nuclei abnormalities, but with limited information provided about the clinical data and cellular senescence rate [9]. The causative mutation, p.L438F, was shown to reduce ZMPSTE24 activity drastically and produce an impaired capacity to process prelamins A maturation both *in vitro* [10] and in the patient's cells, where the normal allele insufficiently compensates ZMPSTE24 deficiency [9]. In the present study, we show that fibroblasts carrying the mutation p.L438F exhibit accelerated senescence linked to prelamins A accumulation.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures

Primary fibroblast cultures were performed after patient's skin biopsies. Control fibroblasts from a non-obese non-diabetic individual (strain 7095) were provided by the Centre de Ressources Biologiques Timone. Fibroblasts were cultivated in DMEM medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 15% fetal bovine serum (Eurobio, Courtaboeuf, France), 1% L-glutamine 200 mM (Life Technologies, Thermo Fisher Technologies) and 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin (PAA Laboratory), in a culture flask of 25 cm² (SPL Life Sciences, Korea), under controlled atmospheric conditions (10% O₂, 5% CO₂, and 85% N₂) at 37 °C with 95% humidity.

2.2. Molecular Studies

DNA was extracted from patient's fibroblasts using NucleoSpin[®] Tissue XS (Machinery-Nagel, Germany) and purified using a QIAamp[®] DNA Micro Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturers protocols. The target regions corresponded to the following genes: SREBF1, RETN, PPARG, PLIN1, LEP, LEPR, GHRL, FKRP, BSCL2, ADIPOQ, AGPAT2, and FTO. The capture was performed with reagents from a custom design HaloPlex Target Enrichment kit (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA), according to the HaloPlex Target Enrichment For Ion Torrent Sequencing Version D4. Libraries were quantified and qualified using the Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) and the Agilent 2100 Bioanalyzer instrument (High Sensitivity DNA Kit) to enable equi-molar pooling of barcoded samples. Template preparation, emulsion PCR, and Ion Sphere Particles (ISP) enrichment were carried out using the Ion PI™ Template OT2 200 Kit v2 on the Ion OneTouch™ 2 System (Thermo Fisher Scientific Inc.). The quality of the ISPs was assessed using a Qubit 2.0 Fluorometer, and the ISPs were loaded and sequenced on a Ion PI™ Chip Kit v2 using Ion PI™ Sequencing 200 Kit v2 on the Ion Proton™ Sequencer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Raw data were first aligned with the provided software suite included with the Ion Proton system to generate BAM files. The coverage and sequencing depth analysis were computed using the BEDtools suite v2.17 [11] and in-house scripts. Variants were identified using the Torrent Browser Variant caller (version 4.0.2), annotated and prioritized with the in-house “VarAFT” system that includes Annovar [12].

2.3. Immunofluorescence

Fibroblasts were grown on coverslips (Lab-tek, SPL Life Sciences) after 30 nM small interference RNA (siRNA) treatment for 48 h and fixed in 4% PAF solution (paraformaldehyde) for 10 min. The antibody used against lamin A/C (SC 6215, Santa Cruz Biotechnology Inc.) was associated with a secondary antibody coupled to Texas Red dye (donkey anti-goat IgG H & L, Alexa Fluor® 594, ab150132, Abcam®, Paris, France). The fibroblast nuclei were stained by DAPI (diaminido-2-phenylindole hydrochloride). Criteria for nuclear anomalies were: aberrant nuclear lamin A staining pattern, aberrant lamin A cytoplasmic localization, and aberrant nucleus shape. Between 100 and 150 cell nuclei were examined in each condition. Cells were observed at a ×100 objective and representative pictures of nuclear anomalies were taken on ApoTome (ZEISS, Germany) and worked with Image J (National Institutes of Health, USA).

2.4. Population Doubling Level

The population doubling level (PDL) was calculated with the mathematical relation $\log_2(D/D_0)$ with D_0 representing the seeded cells and D the harvested cells [13]. The PDL was measured for four weeks (passages 10 to 21). Senescence was complete when PDL was inferior or equal to zero.

2.5. SiRNA

SiRNA treatment was directed against lamin A 3'UTR and a scrambled siRNA was used as a negative control. 40,000 and 150,000 fibroblasts were seeded in coverslips (Lab-Tek, SPL Life Science) and 6-well plates (VWR Plates, Fontenay-sous-Bois, France) for immunofluorescence and western blot analysis. When 70% confluent was reached, the fibroblasts were transfected using a JetPrime kit (Polyplus Transfection, Illkirch, France) with siRNA at 30 nM. The cells were then incubated for 48 h.

2.6. Western Blotting

Total fibroblast proteins were extracted in 200 µL of NP40 Cell Lysis buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Fibroblasts were incubated for 30 min at 4 °C, sonicated four times (30 s on/off each), and centrifuged at 10,000 g for 10 min. Protein concentration was quantified using a Pierce BCA Protein Assay Kit (bicinchoninic acid) and absorbance was measured at 562 nm using a Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). 40 µg were loaded into 7% Tricine acetate gel (Criterion™ XT precast gel) using XT Tricine running Buffer (Biorad, USA). After electrophoresis, gels were electro transferred onto nitrocellulose membranes or Immobilon-FL polyvinylidene fluoride membranes (Millipore), blocked in Odyssey Blocking Buffer diluted 1:1 in TBS for 1 h at room temperature, and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. These primary antibodies were diluted in blocking buffer with 0.1% Tween 20, 1:1000 rabbit polyclonal anti-lamin A/C (sc-20681, Santa Cruz Biotechnology) and 1:40,000 monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (MAB374, Merck Millipore). Membranes

were washed with TBS and 0.1% Tween 20 and then incubated with 1:10,000 IR-Dye 800-conjugated secondary donkey anti-rabbit or IR-Dye 700-conjugated secondary anti-mouse antibodies (LI-COR Biosciences) in blocking buffer with 0.1% Tween 20 and 0.1% SDS (LI-COR Biosciences). Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) was used to reveal the membranes. GAPDH was used as total cellular protein loading control.

2.7. Senescence-Associated Beta-Galactosidase Assay

Senescence-associated beta galactosidase activity was evaluated using the Beta-Glo[®] Assay System (Promega Corporation, USA). The Beta-Glo[®] reagent is constituted by 6-O- β -galactopyranosyl-luciferin substrate cleaved by β -galactosidase to form luciferin that is then catalyzed by luciferase in the presence of cofactors to produce light. The luminescent signal generated is proportional to the amount of β -galactosidase. Experiments were performed according to the manufacturer's instructions, in 96-well white-walled plates (VWR, International SAS, Strasbourg, France). A volume of 100 μ L of culture containing 10,000 cells was dropped into each well in quadruple. After 48 h, the culture medium was changed using DMEM without red phenol (Gibco[®], Cell Culture, Invitrogen, Corporation, San Diego, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, Courtaboeuf, France), 1% L-glutamine 20 mM (Life Technologies, Thermo Fisher Technologies) and 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin (PAA Laboratory), to avoid interferences that can affect the luminescent signal. This was followed by the addition of 100 μ L of Beta-Glo[®] reagent per well 30 min before the measurement of the luminescence on the Glomax[®] luminometer (Promega Corporation). Another experiment has been performed on cells cultured in the presence of 30 nM of siRNA targeting lamin A 3'UTR for 24 h, before the addition of Beta-Glo[®] reagent. The experiments were performed five times on quadruple samples of control and patient at passage 16.

2.8. Cellular BrdU Labelling

Cell proliferation was assessed by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation using the Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit (Roche Applied Science). 10,000 fibroblasts were deposited in each well in a final volume of 100 μ L and incubated for 24 h in humidified atmosphere at 37 °C. Then, 10 μ L of BrdU was added to each well and cells were re-incubated for another 24 h period. The manufacturer's protocol was followed and 5 min after the addition of the substrate, 25 μ L of H₂SO₄ 1 M were added to each well allowing the reading of the absorbance at 450 nm (reference wavelength: 600 nm) on the Glomax[®] reader (Promega Corporation). The experiments were performed five times on quadruples samples at passage 16.

2.9. Statistical Analysis

The sample size being too small to pass the Normality test ($n = 5$), we used the Mann-Whitney non-parametric test to assess statistical significance between the two groups (control and patient). An ANOVA test was used for the statistical analysis of PDL. The significance threshold was defined as $p < 0.05$. Statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Patient Description

The patient is a native of New Caledonia, a French overseas territory located in the Southwest Pacific Ocean. He was referred for android obesity associated with type 2 diabetes diagnosed at age 39 (weight at diagnosis > 100 kg), requiring insulin five years after initial diagnosis. At age 47, his height was 195 cm, weight = 144 kg, BMI = 37.9 kg/m², waist circumference = 130 cm, hip circumference = 120 cm, thigh circumference = 63 cm. There were clinical and biological evidences of insulin resistance with acanthosis nigricans in the axillae and cervical regions (Figure 1A), increased

fasting plasma insulin (89.4 mUI/L (normal range: 6.5–29.1) and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR at 29). However, his insulin requirement dose was relatively small (0.13 UI/kg), and he was only treated with basal insulin and oral antidiabetic drugs, with a good glycemic control (HbA1c = 7.5%). Physical examination revealed an imposing physical appearance, with android obesity and fat accumulation in the neck and face, supraclavicular filling, buffalo neck but no obvious clinical subcutaneous lipoatrophy, nor calf hypertrophy or muscle weakness (Figure 1A).

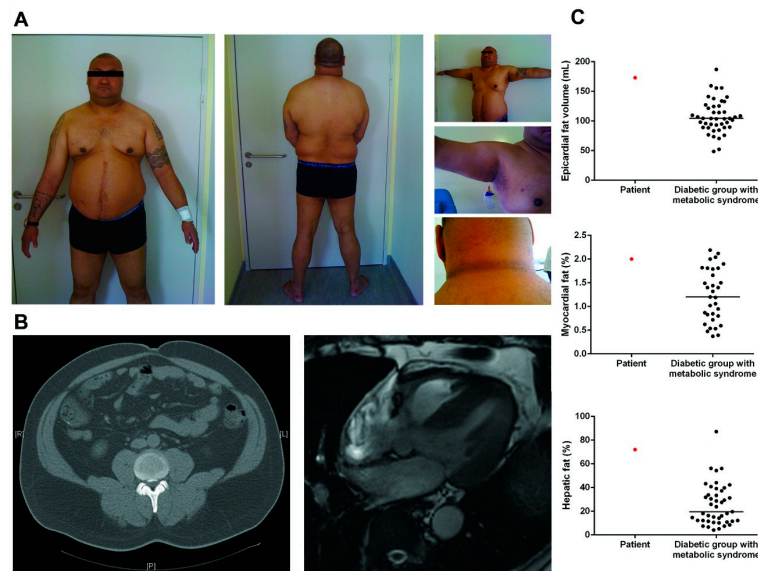


Figure 1. Patient's description. (A) Photographs of the patient carrying the heterozygous *ZMPSTE24* missense mutation L438F, showing an accumulation of facial and cervical fat, android obesity, acanthosis nigricans, and no lower limb lipoatrophy; (B) Abdominal CT scan and cardiac-MRI of the patient showing the presence of superficial and deep subcutaneous adipose tissue and accumulation of cardiac ectopic fat; (C) Quantification of patient epicardial fat volume, myocardial, and hepatic triglyceride content using 3T MRI and proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS). Comparison of patient's ectopic fat depots with a group of type 2 diabetic subjects with metabolic syndrome matched for age and BMI.

He suffered from hypertension, hypertriglyceridemia (fasting triglycerides = 2.05 g/L, HDL cholesterol = 0.38 g/L, LDL cholesterol = 0.46 g/L and total cholesterol = 1.25 g/L), was a current smoker, and reported current alcohol consumption. Routine investigations showed a slight increase in the level of Creatine Kinase (281 UI/L; normal range <170) without muscular or articular pain. Liver enzymes were in the normal range (AST 36 UI/L; ALT 35 UI/L; GGT 27 UI/L and PAL 84 UI/L). An abdominal echography showed hepatomegaly with hepatic steatosis (Figure 1B). Cardiac investigations revealed a dilated cardiomyopathy with a left ventricular ejection fraction (LV-EF) of 25%–30%, which required treatment with beta-blockers, diuretics, and angiotensin converting enzyme inhibitors. The 24 h ECG showed slight conduction disturbances with isolated polymorphic ventricular extrasystoles. After six years of treatment, the patient recovered normal echographic and Magnetic Resonance Imaging (MRI) LV-EF (50%). Pulmonary function testing showed a mild restrictive defect (−20%) and hypoxemia at rest (71 mmHg). An abdominal computed tomography (CT) scan confirmed that abdominal subcutaneous lipoatrophy was absent (Figure 1B).

The patient fulfilled all the International Diabetes Federation (IDF) diagnosis criteria for metabolic syndrome and also fulfilled all the criteria of National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP-III) definition with five criteria fulfilled out of five.

Serum adipokines were assessed and revealed that adiponectin was low 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3.8–11.8), confirming the decrease in insulin sensitivity, and serum leptin was measured at 49.8 ng/mL (1–12.5).

Cardiovascular magnetic resonance imaging at 3T and proton magnetic resonance spectroscopy revealed increased ectopic fat accumulation (Figure 1B). In particular, epicardial fat volume was highly increased at 173 cm^3 , myocardial and hepatic triglycerides content were extremely high at 2% and 72%, respectively and were higher than in a group of type 2 diabetics with MS, matched for age and BMI (Figure 1C). The patient had a brother who was described as having the same morphotype, but familial genetic screening could not be performed as the patient had broken off their relationship.

Direct sequencing of *LMNA* and *ZMPSTE24* revealed the heterozygous missense mutation c.1312C > T (p.L438F) in *ZMPSTE24* as the only variation in these genes. This mutation was predicted as pathogenic in silico (with a maximal score of 1 in Polyphen). To rule out the presence of another variant in another gene, we performed high throughput sequencing of a genes panel including those commonly associated with obesity, lipodystrophy, and metabolic syndrome. No other variant with non-ambiguous signification was evidenced.

3.2. Nuclear Shape Anomalies and Senescence Studies

Altered lamin A staining was observed in patients cells with reduced signal and heterogeneous staining with aggregates whereas lamin B and Emerin staining were normal (Figure 2A). Nuclear shape anomalies were quantified in primary fibroblasts and in lymphoblastoid cells at different passages and were found significantly increased when compared to control cells (Figure 2B).

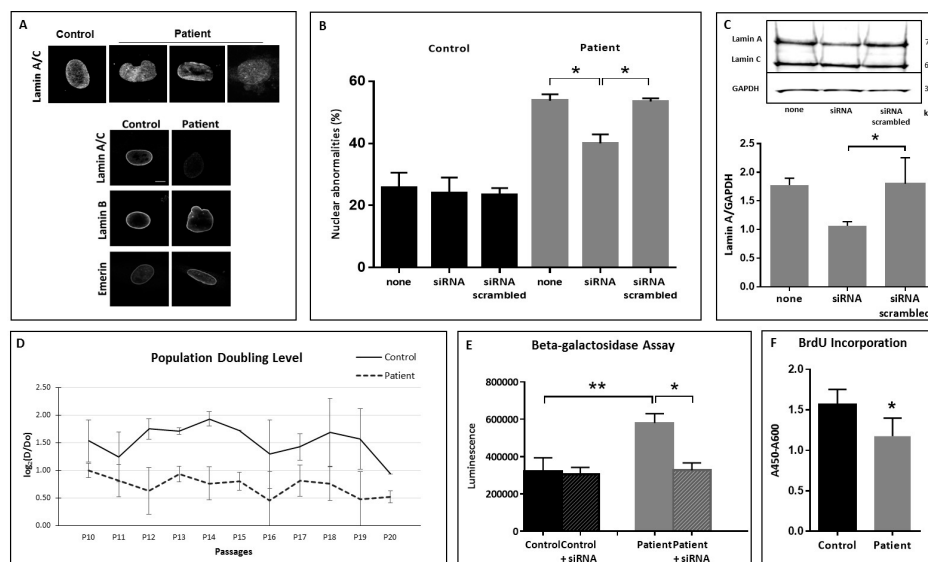


Figure 2. Nuclear shape anomalies and senescence tests. (A) Representative pictures of nuclear anomalies. Upper panel: aberrant nuclear pattern, aberrant cytoplasmic localization and aberrant shape after lamin A staining. Fibroblasts were examined with Apotome.2 (Zeiss) stereomicroscope under oil immersion ($100\times$ magnification). Lower panel: representative pictures of nuclear anomalies with different staining (Lamin A/C, Lamin B and Emerin); (B) Quantitative estimation of dysmorphic nuclei in control and patient fibroblasts with and without siRNA. Asterisks correspond to p values of 0.0268; (C) Representative Western Blot and quantitative estimation of lamin A in patient fibroblasts with and without siRNA. Asterisk corresponds to a p value of 0.0286; (D) Population Doubling Level. ANOVA showed $p < 0.0001$ between control and patient PDL; (E) Senescence related beta-galactosidase activity before and 24h after siRNA treatment. The double asterisk corresponds to a p value of 0.0079; the asterisk corresponds to a p value of 0.0159. (F) BrdU incorporation. Asterisk corresponds to a p value of 0.0173. In all experiments, “control” was fibroblasts from healthy people.

In order to confirm that these nuclear anomalies were related to prelamin A accumulation, cells were cultured in the presence of siRNA directed specifically to the 3' region of lamin A transcripts and aimed at reducing the translation of prelamin A. Decreased lamin A production following treatment

by oligonucleotides was confirmed by Western Blotting and was estimated between 40% and 30% (Figure 2C). Then, abnormal nuclear shapes and lamin A staining were evaluated after siRNA treatment and showed that decreased lamin A production was associated to a significantly decreased number of abnormal nuclei in the patient cells ($p = 0.0268$) (Figure 2B).

Cellular senescence was investigated in primary fibroblasts by different approaches. Population Doubling Level (PDL) was estimated for control and patients fibroblasts. Whereas the PDL of control fibroblasts remained stable from passage 10 up to passage 19, the proliferation rate of fibroblasts carrying the ZMPSTE24 mutation L438F was constantly lower than the control and decreased rapidly after passage 16 ($p < 0.0001$ with an ANOVA test) (Figure 2D). In addition, the ZMPSTE-mutated fibroblasts had a significantly increased senescence-associated β -galactosidase activity, as compared to control cells at the same passage whereas β -galactosidase activity returned to control level when fibroblasts were cultured in the presence of siRNA interfering with the translation of prelamin A (Figure 2E). At last, fibroblasts displayed a striking decrease in replicative capacity, measured in terms of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (Figure 2F). Altogether, senescence investigation showed a significantly increased senescence rate for the patient's cells compared to control cells at the same passage ($0.0001 < p < 0.0286$ according to the experiments).

4. Discussion

In the present study, we describe the detailed phenotype of partial lipodystrophy with senescence features associated with a heterozygous missense mutation in ZMPSTE24 and prelamin A accumulation. Up to now, pathological phenotypes related to mutations in ZMPSTE24 were linked to homozygous or compound heterozygous mutations and resulted in RD, MAD, or progeria-like syndromes. Thus, the genetics of the ZMPSTE24 diseases would indicate that usually, haplo-insufficiency is not causative of a pathological phenotype. In order to confirm this point, we interviewed four unrelated individuals carrying the recurrent null mutation c. 1085_1086insT in heterozygous condition. These individuals were searched for ZMPSTE24 mutations since they have had a child with RD. All of them were more than 40 years old and one more than 60. None of them reported lipodystrophy, type 2 diabetes, or hypertriglyceridemia for them or for their close relatives (parents and siblings). This suggests strongly that the mutation L438F has a dominant negative effect leading to an insufficient compensation of decreased activity by the normal allele.

Familial partial lipodystrophies (FPL) are rare genetic diseases that share some features with the metabolic syndrome, making clinical diagnosis challenging. Central obesity with metabolic disturbances such as hypertension, insulin-resistance, or glucose intolerance is very common worldwide with the increase in the obesity epidemic [14]. Several studies have indicated that FPL may have a greater prevalence than previously thought due to a lack of recognition of subtle forms, especially when the extent of fat loss is moderate [15]. Decaudain *et al.* sequenced the *LMNA* coding regions in 277 unrelated adults investigated for lipodystrophy and/or insulin resistance and demonstrated that patients with non-codon 482-associated mutations often lacked lipodystrophy on physical examination [16]. A study of 5000 non-obese type 2 diabetic patients found that among those with a body mass index $< 27 \text{ kg/m}^2$ and high insulin requirements ($> 100 \text{ U/day}$), there were five subjects with previously unrecognized FPL [17]. Accordingly, we identified in 87 patients with common MS, 11% with abnormal nuclear shape and disturbed lamin A/C nuclear distribution [9]. These studies strongly suggest that there is a high variability in clinical presentation for the partial lipodystrophies, and that FPL can be easily mistaken for common forms of abdominal obesity and MS [18]. In our case, the patient had a high BMI, with high serum leptin, and not so pronounced insulin-resistance in terms of insulin units per kg of body weight per day requirement. However, he had high HOMA-IR, low adiponectin levels, required insulin early in his disease natural history and suffered from dilated cardiomyopathy. Patients with lipodystrophies present metabolic consequences that are remarkably similar to those observed in obesity, but generally more severe, showing that maintaining a healthy subcutaneous amount of fat is an essential requirement for metabolic homeostasis [19]. Indeed,

adipose tissue (AT) is critical in regulating lipid and glucose homeostasis. It buffers lipid excess from over-nutrition by sequestering free fatty acids (FFA) into triglycerides, thereby protecting the other organs from lipotoxicity [20]. In case of absent or dysfunctional subcutaneous AT, the neutral lipid storage capacity of the AT is exceeded and the flow of FFA is redirected to peripheral tissues, such as the muscle, the liver, and the heart. Severe ectopic fat accumulation is an important feature associated with FPL, which can lead to severe complications as the genetically limited expandability of AT drives the accumulation of lipids to non-adipose cells. A human non-invasive quantification of ectopic fat has been developed in recent years and could help in detecting FPL [21]. One recent study has confirmed in six patients with a mutation in *LMNA* that epicardial fat was significantly higher than in healthy controls with matching for sex, age, and BMI [22]. We also report here an extremely high myocardial triglyceride content in this case compared to type 2 diabetic subjects with matching age and BMI. Whether the increase in myocardial fat can be implicated in the occurrence of the dilated cardiomyopathy has been suggested [23,24] but merits further evaluation.

At the molecular level, FPL results from genetic defects either in fat differentiation and formation or from accelerated cellular senescence [25]. The pathophysiological link between partial lipodystrophy and cellular senescence has been previously evoked not only for *LMNA* mutations but also with the description of lipodystrophy syndrome resulting from mutations in *WRN* which encodes the DNA helicase *WRN*, involved in DNA replication and repair [26].

In the absence of familial study, the link between mutation and phenotype is not formally established in this patient. Nevertheless, we showed that the patient's cells exhibit accelerated senescence and that the senescence rate is similar to the rate observed for fibroblasts carrying the R482W *LMNA* mutation, responsible for the FPL Dunnigan Type [27]. In cases of FPL linked to mutations in *LMNA*, the negative impact of causative mutations on the prelamins A processing rate has been well documented [28,29]. The mutated prelamins A that accumulates, binds SREBP1 at the nuclear rim, decreases the pool of active SREBP1 that normally activates PPAR γ , finally causing impairment of pre-adipocyte differentiation [30,31]. This mechanism is probably involved in the case we reported here, where prelamins A accumulates on account of decreased ZMPSTE24 activity. In addition, it has been shown recently that ZMPSTE24 downregulation is, in itself, a major contributor in Vascular Smooth Muscle Cell dysfunctions that could translate into early atherosclerosis at the clinical level [32].

5. Conclusions

We evidenced here at the cellular level, all the features of premature senescence observed in typical laminopathies: abnormal nuclear shape, decreased capacity to proliferate after several passages, decreased transcription activity as shown by BrdU incorporation, and increased senescence-related beta-galactosidase activity.

The patient described here was referred initially for metabolic syndrome complicated by cardiomyopathy and no limb lipoatrophy nor limb muscular hypertrophy. He presented several risk factors such as diabetes, hypertension, low HDL cholesterol, and smoking. This phenotype, although typical, is milder than those usually reported with FPLD type 2 or 3. Alcohol consumption may be a confounding factor and could have contributed to liver steatosis and to dilated cardiomyopathy. Penetrance may be incomplete and other risk factors may be necessary to reveal the clinical effects of premature senescence. For these reasons, this condition may be under-diagnosed among metabolic syndromes.

Acknowledgments: The authors sincerely thank the patient for his kind contribution to this study. They acknowledge Laurence Olivier-Faivre (Dijon), Elisabeth Kremer (Strasbourg), and Cecile Rouzier (Nice) for their help in interviewing individuals with *ZMPSTE24* null-mutations.

Author Contributions: B.C., R.P., B.M. and A.D. conceived and designed the experiments; D.G., D.C., L.A., C.C., A.I. and M.F. performed the experiments; D.C., B.-P. N., G. B., L.N. and B.P. analyzed the data; G.B. and B.C. wrote the paper.

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

References

1. Barrowman, J.; Michaelis, S. ZMPSTE24, an integral membrane zinc metalloprotease with a connection to progeroid disorders. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 761–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. De Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Cau, P.; Navarro, C.; Amiel, J.; Boccaccio, I.; Lyonnet, S.; Stewart, C.L.; Munnich, A.; Le Merrer, M.; *et al.* Lamin a truncation in hutchinson-gilford progeria. *Science* **2003**, *300*, 2055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Eriksson, M.; Brown, W.T.; Gordon, L.B.; Glynn, M.W.; Singer, J.; Scott, L.; Erdos, M.R.; Robbins, C.M.; Moses, T.Y.; Berglund, P.; *et al.* Recurrent de novo point mutations in lamin a cause hutchinson-gilford progeria syndrome. *Nature* **2003**, *423*, 293–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cau, P.; Navarro, C.; Harhouri, K.; Roll, P.; Sigaudy, S.; Kaspi, E.; Perrin, S.; de Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N. Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Navarro, C.L.; Cadinanos, J.; de Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Courrier, S.; Boccaccio, I.; Boyer, A.; Kleijer, W.J.; Wagner, A.; Giuliano, F.; *et al.* Loss of ZMPSTE24 (face-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of lamin a precursors. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1503–1513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Navarro, C.L.; Esteves-Vieira, V.; Courrier, S.; Boyer, A.; Duong Nguyen, T.; Huong le, T.T.; Meinke, P.; Schroder, W.; Cormier-Daire, V.; Sznajder, Y.; *et al.* New ZMPSTE24 (face1) mutations in patients affected with restrictive dermopathy or related progeroid syndromes and mutation update. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **2014**, *22*, 1002–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Navarro, C.L.; Cau, P.; Levy, N. Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, R151–R161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Agarwal, A.K.; Fryns, J.P.; Auchus, R.J.; Garg, A. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 1995–2001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Dutour, A.; Roll, P.; Gaborit, B.; Courrier, S.; Alessi, M.C.; Tregouet, D.A.; Angelis, F.; Robaglia-Schlupp, A.; Lesavre, N.; Cau, P.; *et al.* High prevalence of laminopathies among patients with metabolic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 3779–3786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Barrowman, J.; Wiley, P.A.; Hudon-Miller, S.E.; Hrycyna, C.A.; Michaelis, S. Human ZMPSTE24 disease mutations: Residual proteolytic activity correlates with disease severity. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 4084–4093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. Bedtools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, K.; Li, M.; Hakonarson, H. Annovar: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Martens, U.M.; Chavez, E.A.; Poon, S.S.; Schmoor, C.; Lansdorp, P.M. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res.* **2000**, *256*, 291–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. O'Neill, S.; O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2015**, *16*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rother, K.I.; Brown, R.J. Novel forms of lipodystrophy: Why should we care? *Diabetes Care* **2013**, *36*, 2142–2145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Decaudain, A.; Vantyghem, M.C.; Guerci, B.; Hecart, A.C.; Auclair, M.; Reznik, Y.; Narbonne, H.; Ducluzeau, P.H.; Donadille, B.; Lebbe, C.; *et al.* New metabolic phenotypes in laminopathies: Lmna mutations in patients with severe metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 4835–4844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Visser, M.E.; Kropman, E.; Kranendonk, M.E.; Koppen, A.; Hamers, N.; Stroes, E.S.; Kalkhoven, E.; Monajemi, H. Characterisation of non-obese diabetic patients with marked insulin resistance identifies a novel familial partial lipodystrophy-associated ppargamma mutation (y151c). *Diabetologia* **2011**, *54*, 1639–1644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cortes, V.A.; Fernandez-Galilea, M. Lipodystrophies: Adipose tissue disorders with severe metabolic implications. *J. Phys. Biochem.* **2015**, *71*, 471–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Vatier, C.; Bidault, G.; Briand, N.; Guenantin, A.C.; Teyssieres, L.; Lascols, O.; Capeau, J.; Vigouroux, C. What the genetics of lipodystrophy can teach us about insulin resistance and diabetes. *Curr. Diabetes Rep.* **2013**, *13*, 757–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Vigouroux, C.; Caron-Debarle, M.; Le Dour, C.; Magre, J.; Capeau, J. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: From adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 862–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bizino, M.B.; Sala, M.L.; de Heer, P.; van der Tol, P.; Smit, J.W.; Webb, A.G.; de Roos, A.; Lamb, H.J. MR of multi-organ involvement in the metabolic syndrome. *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* **2015**, *23*, 41–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Godoy-Matos, A.F.; Valerio, C.M.; Braganca, J.B.; Oliveira Rde, A.; Zagury, R.L.; Lustosa Rde, P.; Camargo, G.C.; Nascimento, C.A.; Moreira, R.O. Evaluation of epicardial adipose tissue in familial partial lipodystrophy. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2015**, *7*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gaborit, B.; Kober, F.; Jacquier, A.; Moro, P.J.; Cuisset, T.; Boullu, S.; Dadoun, F.; Alessi, M.C.; Morange, P.; Clement, K.; *et al.* Assessment of epicardial fat volume and myocardial triglyceride content in severely obese subjects: Relationship to metabolic profile, cardiac function and visceral fat. *Int. J. Obes.* **2012**, *36*, 422–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nelson, M.D.; Victor, R.G.; Szczepaniak, E.W.; Simha, V.; Garg, A.; Szczepaniak, L.S. Cardiac steatosis and left ventricular hypertrophy in patients with generalized lipodystrophy as determined by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Am. J. Cardiol.* **2013**, *112*, 1019–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Guenantin, A.C.; Briand, N.; Bidault, G.; Afonso, P.; Bereziat, V.; Vatier, C.; Lascols, O.; Caron-Debarle, M.; Capeau, J.; Vigouroux, C. Nuclear envelope-related lipodystrophies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *29*, 148–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Donadille, B.; D’Anella, P.; Auclair, M.; Uhrhammer, N.; Sorel, M.; Grigorescu, R.; Ouzounian, S.; Cambonie, G.; Boulot, P.; Laforet, P.; *et al.* Partial lipodystrophy with severe insulin resistance and adult progeria werner syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **2013**, *8*, 106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Caron, M.; Auclair, M.; Donadille, B.; Bereziat, V.; Guerci, B.; Laville, M.; Narbonne, H.; Bodemer, C.; Lascols, O.; Capeau, J.; *et al.* Human lipodystrophies linked to mutations in a-type lamins and to hiv protease inhibitor therapy are both associated with prelamin a accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1759–1767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bidault, G.; Garcia, M.; Vantyghem, M.C.; Ducluzeau, P.H.; Morichon, R.; Thiyagarajah, K.; Moritz, S.; Capeau, J.; Vigouroux, C.; Bereziat, V. Lipodystrophy-linked lmna p.R482w mutation induces clinical early atherosclerosis and *in vitro* endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2162–2171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Andre, P.; Schneebeli, S.; Vigouroux, C.; Lascols, O.; Schaaf, M.; Chevalier, P. Metabolic and cardiac phenotype characterization in 37 atypical dunnigan patients with nonfarnesylated mutated prelamin a. *Am. Heart J.* **2015**, *169*, 587–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Capanni, C.; Mattioli, E.; Columbaro, M.; Lucarelli, E.; Parnaik, V.K.; Novelli, G.; Wehnert, M.; Cenni, V.; Maraldi, N.M.; Squarzoni, S.; *et al.* Altered pre-lamin a processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1489–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Vadrot, N.; Duband-Goulet, I.; Cabet, E.; Attanda, W.; Barateau, A.; Vicart, P.; Gerbal, F.; Briand, N.; Vigouroux, C.; Oldenburg, A.R.; *et al.* The p.R482w substitution in a-type lamins deregulates srebp1 activity in dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 2096–2109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Afonso, P.; Auclair, M.; Boccara, F.; Vantyghem, M.C.; Katlama, C.; Capeau, J.; Vigouroux, C.; Caron-Debarle, M. Lmna mutations resulting in lipodystrophy and hiv protease inhibitors trigger vascular smooth muscle cell senescence and calcification: Role of ZMPSTE24 downregulation. *Atherosclerosis* **2015**, *245*, 200–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



**II. Article: Identifying patients with *LMNA* mutations:
linking metabolic phenotype to cellular senescence**

Title: Identifying patients with *LMNA* mutations: linking metabolic phenotype to cellular senescence

Author List and Affiliations: Camille DESGROUAS (Pharm D, PhD)^{1,2}, Damien GALANT (MSc)¹, Alice-Anais VARLET (PhD)¹, Françoise MERONO (MSc)¹, Nathalie BONELLO-PALOT (Pharm D, PhD)^{1,3}, Patrice BOURGEOIS (PhD)^{1,3}, Clara VINCENTELLI (MD)^{4,5}, Anne DUTOUR (MD, PhD)^{4,5}, Nicolas LEVY (MD, PhD)^{1,3}, Catherine BADENS (Pharm D, PhD)^{1, 3,*}, Bénédicte GABORIT (MD, PhD)^{4,5}

¹ Aix Marseille Univ, INSERM, GMGF, Marseille, France

² Aix Marseille Univ, Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

³ APHM, CHU de la Timone, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Marseille, France

⁴ Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France

⁵ APHM, Endocrinology, Metabolic diseases and nutrition department, Marseille, France

*Corresponding author: Catherine BADENS

UMR 1251 Marseille Medical Genetics

Faculté de médecine

27 Bd Jean Moulin

13385 Marseille cedex 5

33 491 32 49 25

33 491 38 46 76

catherine.badens@univ-amu.fr

Highlights:

- *LMNA* mutations are linked to severe metabolic syndrome (MS) and premature senescence.
- Two rare heterozygous missense mutations in *LMNA* are functionally studied.
- Cells carrying the mutations showed altered replication capacity and high senescence rate.
- Expression of mutated prelamin A resulted in significant increase of nuclear anomalies.
- Nuclear anomalies of patients cells are decreased by the use of siRNA targeting specifically the prelamin A.

Journal : MDPI Cells : <https://www.mdpi.com/journal/cells/instructions>

Abstract (200 words max)

Our study assess the cellular phenotype associated with two missense heterozygous mutations in lamin A/C coding gene *LMNA*, c.1745G>T (p.Arg582Leu) and c.1892G>A (p.Gly631Asp) in patients with early onset of hypertriglyceridemia, coronary artery disease and insulin resistance.

We investigated cellular senescence by measuring beta-galactosidase expression, multiplication capacity of patients cells by following 5-bromo-2'-desoxyuridine incorporation and by quantifying nuclear abnormalities linked to premature aging. To determine a cause-effect relationship, we also performed transient expression of cDNA encoding the two mutated prelamin A in control fibroblasts and of siRNA targeting specifically the prelamin A. Nuclear shape was observed by immunostaining and lamin A expression was quantified by Western-blotting.

Functional studies suggested an accelerated senescence of patient cells associated with an elevation of beta-galactosidase activity and nuclear anomalies and with a decrease of multiplication capacity. In cellular models, the expression of mutated prelamin A in control cells phenocopied misshapen nuclei while lamin A level expression decrease in patient cells restore nuclear morphology. Thus, results suggested a link between lamin A mutant expression and senescence phenotypes.

Our results suggested that mutations in *LMNA* associated with severe metabolic phenotype are linked to premature senescence.

Key words: dyslipidemia, metabolic syndrome, lamin A/C, nuclear anomalies, and premature senescence.

Introduction

Lipodystrophies correspond to a group of heterogeneous pathologies leading to an abnormal fat distribution. They can result from several causes as genetic defects, autoimmune mechanisms, or iatrogenic of which anti-VIH tritherapy drugs and corticoids [1]. Genetic lipodystrophies represent a rare subtype with a prevalence roughly valued to 1 per 100,000 people. It exists two clinical forms well described: congenital generalized lipodystrophies tissue characterized by a total absence of subcutaneous adipose tissue and familial partial lipodystrophies (FPLD) marked by partial abnormal fat distribution [2].-Few genes have been associated with FPLD: *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *CIDECA*, *LIPE*, *AKT2*. These genes encode for proteins highly expressed in the adipose tissue and playing a role in its development [3].The major subtype of lipodystrophy is FPLD2, commonly named Dunnigan syndrome which seems to be induced by *LMNA* mutations. FPLD2 is clinically defined by abnormal fat distribution characterized by lower limbs lipoatrophy and hypertrophy of adipose tissue located on the central region: the neck and the trunk. Patients suffer from metabolic complications such as insulin resistance, severe hypertriglyceridemia, hepatic steatosis and develop cardiac, hepatic and pancreatic comorbidities [4]. Interestingly, women are more often diagnosed than men due to the android appearance triggered by protruding and well-defined musculature [5]. They also suffer from more severe and more precocious metabolic perturbations and from gynecological disorders (polycystic ovarian syndrome, miscarriage, stillbirth) [6]. Among men, phenotypes are more subtle and induce less severe forms [7]. Mutations of *LMNA* causing FPLD2 are autosomal dominant. Moreover, a hot-spot located on the 482 codon is responsible of 80% FPLD2 cases and represent the usually described clinical form [8].

LMNA encodes for lamin A and C proteins as the result of an alternative splicing. These proteins are type V intermediate filaments located at the nuclear lamina, a meshwork underlying the inner nuclear membrane. Lamins participate to the nuclear structure and the chromatin-nuclear lamina connection [9]. *LMNA* related diseases are gathered in a group called "laminopathies". More than 200 pathogenic variants in *LMNA* have been described affecting a specific tissue or leading to a multisystemic defect [10,11]. In this context, Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) and mandibulo-acral dysplasia (MAD-A) constitute the multisystemic laminopathies. They are characterized by premature aging disorders combined with numerous defects: growth retardation, lipodystrophy, incomplete osteogenesis, myopathy, premature senescence, and facial clinical features [12]. Other laminopathies affect specific tissues including striated muscles (Emery-Dreifuss muscular dystrophy), cardiac muscle (Dilated cardiomyopathies), peripheral nerves (Charcot-Marie Tooth disorder type 2) and fat tissue, i.e. adipocytes (FPLD2) [8]. In few cases, *LMNA* mutations have been also involved in metabolic syndrome (MS), which shares common features with FPLD2 such as dyslipidemia, insulin resistance and abnormal fat distribution [5,13,14].

At cellular level, most of *LMNA* mutations are associated with cell proliferation decrease, premature senescence, misshapen nuclei, chromatin remodeling. All these phenotypes were directly or indirectly linked to the development of laminopathies [15–17].

Since *LMNA* mutations are known to induce premature senescence and misshapen nuclei notably observed in HGPS [17,18], we performed functional studies to assess the effect of two rare heterozygous missense mutations of *LMNA* on the cells proliferation capacity and on the cellular phenotype of the patients carrying these mutations.

Material and Methods

Patients

The two patients reported here were initially referred at the Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille ,endocrinology metabolic diseases and nutrition department (North and Conception hopital) for insulin resistant diabetes care and one of them was part of a 100 patients cohort described previously [14]. They gave their written informed consent for this study. DNA samples and primary fibroblast were available for the 2 patients and stored at the certified Biological Resource Center (CRB TAC component (NF S96-900 & ISO 9001 v2015 Certification)).

Plasmids and siRNAs

The two *LMNA* missenses mutations NM_170707.3: c.1892G>A (p.Gly631Asp) rs267607648 and NM_170707.3: c.1745G>T (p.Arg582Leu) rs57830985 (patient 2) were introduced using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) in the *LMNA* cDNA cloned in the pEGFP-C1 vector system as a template (Clontech Laboratories Inc.). Mutagenic primers were designed using QuikChange Primer Design Program available online at <https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp> (Table 1). The presence of the two mutations was checked by direct sequencing (Table 1) according to standard procedures on ABI3500XL (Life Technologies, Carlsbad, C.A, U.S.A.). Mutations are numbered according to the GenBank reference sequence NM_170707.3 and the Human Genome Variation Society recommendations (<http://varnomen.hgvs.org/>).

Table 1: List of primers and siRNA

Primer	Forward	Reverse	Experiment
c.1745C>T	CACGGTGCGCGAGAGCAGGTTGTACTC	GAGTACAACCTGCTCTCGCGCACCGTG	Directed mutagenesis
exons 1-3	TCC GAG CAG TCT CTG TCC TT	TCT CAA ACT CAC GCT GCT TC	Direct clones sequencing
exons 4-6	GCA GAC CAT GAA GGA GGA AC	AGT TTG CGC TTT TTG GTG AC	
exons 7-9	GGC GAG GAG GAG AGG CTA C	GTC GTC CTC AAC CAC AGT CA	
exons 10-12	GGA AGG CAC AGA ACA CCT G	GGC ATG AGG TGA GGA GGA C	
3'UTR	UUUUCUAAGAGAAGUUAAU	AAUAAUCUUCUUAGAAAA	siRNA

Cell culture and Cell transfection

Cells were cultivated according to methods previously described [19]. Control fibroblast were provided by Coriell Institut or CRB and references of each control cells are referred on Table 2. For cell transfection, Fibroblasts were seeded on coverslips (Lab-tek, SPL Life Sciences) at a density of $2.5 \cdot 10^4$ cells/well. Control fibroblasts AG07095 were transfected with 500 ng of plasmids containing control (pEGFP-C1) or mutated cDNA using jetPRIME® transfection reagent (Polyplus) following the manufacturer instructions. Patients fibroblasts were transfected with small interference RNA (siRNA) using jetPRIME® transfection reagent (Polyplus) following the manufacturer instructions. 48 h post-transfection, cells were fixed in PBS 10 % PFA before being processed for immunofluorescence as described below. Lamin A/C level expression was verified by Western blotting [13,14] using a rabbit polyclonal anti-lamin A/C (sc-20681, Santa Cruz Biotechnology) and monoclonal anti- GAPDH (MAB374, Merck Millipore) as a loading control. Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) was used to reveal the membranes. Quantification of expression levels was performed using Image J (National Institutes of Health, USA).

Table 2: List of control fibrobasts

Provider	Id	Age (y.o)	Gender
Coriell Institute	AG07095 (Control 1)	2	Male
Coriell Institute	AG09309 (Control 2)	21	Female

Cell proliferation ELISA, SA-beta-galactosidase assay and nuclear shape anomalies

To evaluate the senescence rate of patients cells, cells were seeded on coverslips (Lab-tek, SPL Life Sciences) and beta-galactosidase activity was measured using Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology®, The Netherlands) following the manufacturer instructions.

To assess multiplication capacity of patients and control cells, we measured 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. To do so, cells were seeded on 96 well plate at a density of $1 \cdot 10^5$ and BrdU provided by the Cell proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Kit (Roche Applied Science) was added to the cell medium for a 24 h-period after what the ELISA assay was performed following the manufacturer instructions [13].

To quantify nuclear shape anomalies, Lamin A/C immunofluorescence was performed on transfected and fixed cells. Permeabilisation is performed with a 0.5 % Triton® X-100 (Sigma®, USA) and protease inhibitor solution (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, USA) at room temperature for 10 min. Bovine serum albumin (Sigma®, USA) with protease inhibitor for 30 min at room temperature is used for saturation. Slides were washed in PBS before immunostaining. Primary rabbit polyclonal antibody anti-lamin A/C was incubated for 2 h at

room temperature (1:300, SC 6215, Santa Cruz Biotechnology Inc.). After two washes in PBS, the slides were incubated with a secondary antibody coupled to Texas Red dye (1:400, donkey anti-goat IgG H & L, Alexa Fluor® 594, ab150132, Abcam®, Paris, France) for 1 h at room temperature. The cells were then washed twice for 5 min in PBS, then incubated with DAPI (Sigma-Aldrich, USA) at 500 ng/mL in VECTASHIELD® (Vector Laboratories).

Nuclear anomalies criteria were: aberrant nuclear lamin A staining pattern, aberrant lamin A cytoplasmic localization, and aberrant nuclei shape. Between 100 and 150 cell nuclei were examined in each condition. Cells were observed at a ×100 objective and representative pictures of nuclear anomalies were taken on ApoTome (ZEISS, Germany) and worked with Image J (National Institutes of Health, USA).

Statistical analysis

Mann-Whitney non-parametric test was used to assess statistical significance between control and patient. The significance threshold was defined as $p < 0.05$. Statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism 6.07 (San Diego, CA, USA).

Results

Patients description

Patient 1 is a 55 years-old woman referred for early-onset insulin-resistant diabetes mellitus diagnosed at 26, initially treated with metformin, glucagon like peptide 1 analogs, followed by insulin (continuous subcutaneous insulin infusion, daily insulin requirement 2 UI/kg/day with HbA1c = 7.3% (56 mmol/mol)). She had a family history of diabetes mellitus (parents, sister, and one paternal uncle, figure 1). Her nephew had a stroke at 15 years old.

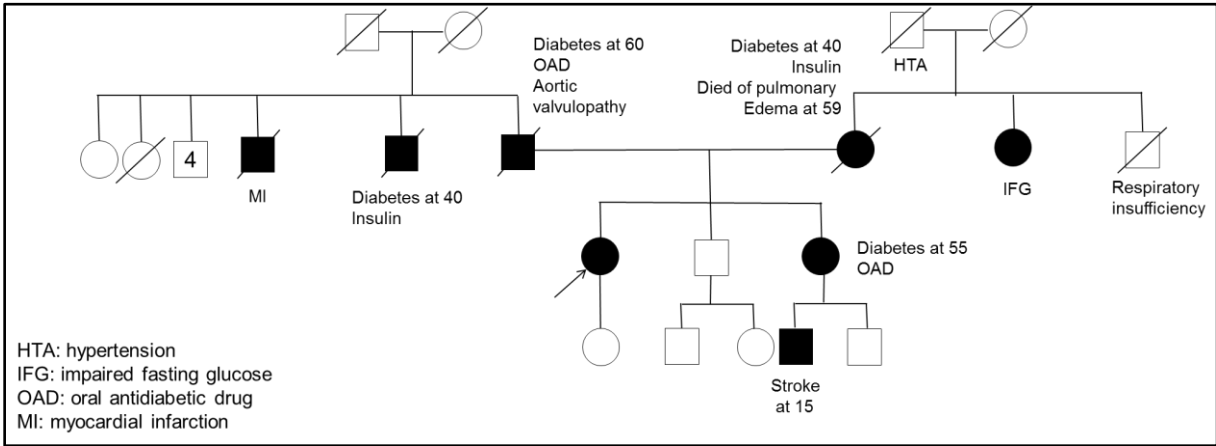


Figure 1: Family history of patient 1.

She presented with high blood pressure (treated by tritherapy), combined dyslipidemia (severe hypertriglyceridemia from 4.5 to 12.5 mmol/L and LDL-cholesterol above 2.58 mmol/L despite high dose statins (rosuvastatin 10 mg/day) and fibrates (fenofibrate 200mg/day), sleep apnea syndrome and asthma. At age 42, she suffered from an acute coronary syndrome, and received 3 stents on left anterior descending artery. She fulfilled all the diagnosis criteria for metabolic syndrome (MS) [20].

Physical examination revealed visceral adiposity, with accumulation of truncal fat, cushingoid morphotype with facial hirsutism, android obesity, but no strict lipoatrophy of lower limbs (Figure 2A). Her anthropometrical features were BMI = 37.1 kg/m², waist circumference (WC) = 118 cm, waist to hip ratio (WHR) = 1.08. Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) revealed 44.3 % of fat mass (Figure 2B) and abdominal computed tomography (CT) confirmed the presence of subcutaneous adipose tissue: superficial (196 cm²) and deep (201 cm²), with excessive visceral fat accumulation (204 cm²) (Figure 2C). The mean adipocyte diameter obtained by needle subcutaneous fat biopsy was 125.7 ± 32.5 µm.

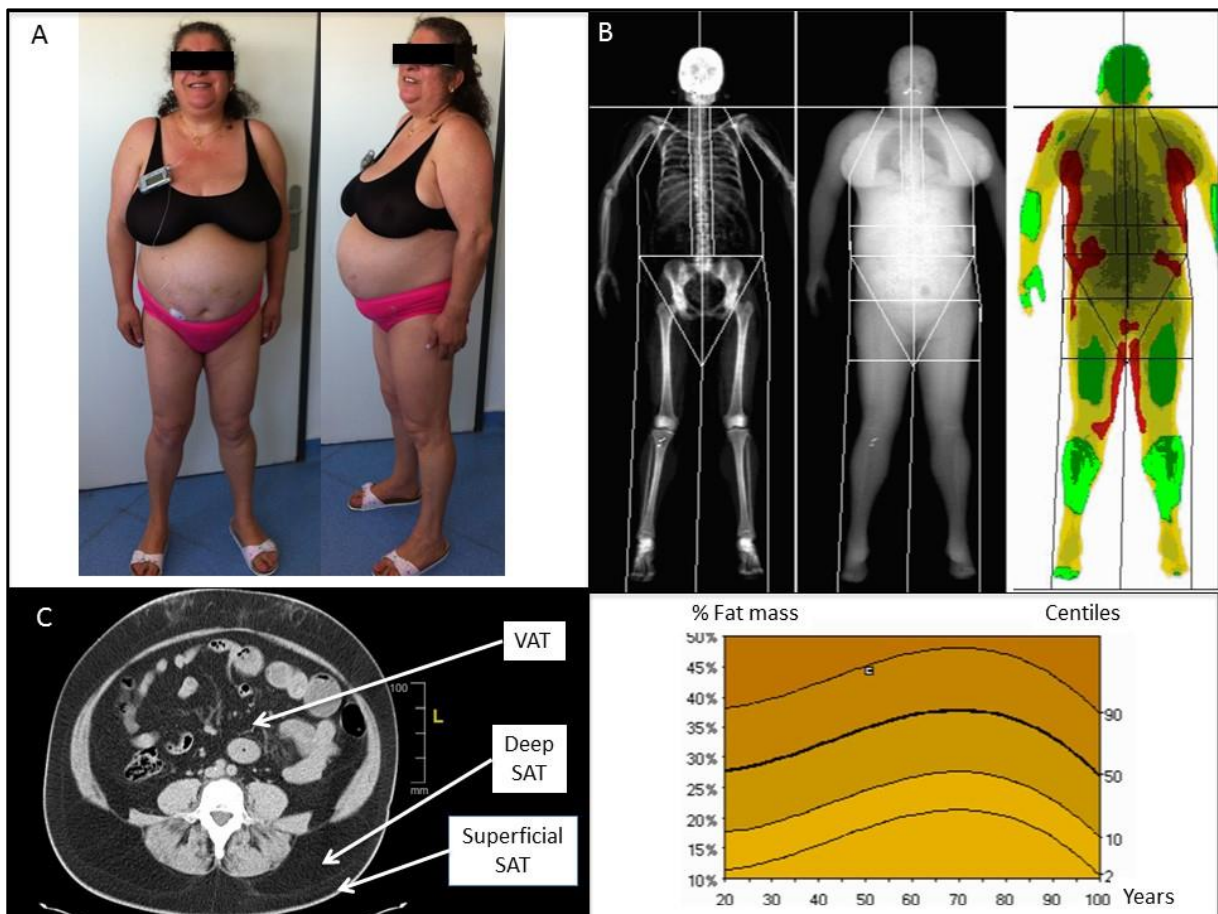


Figure 2: Patient 1 clinical description.

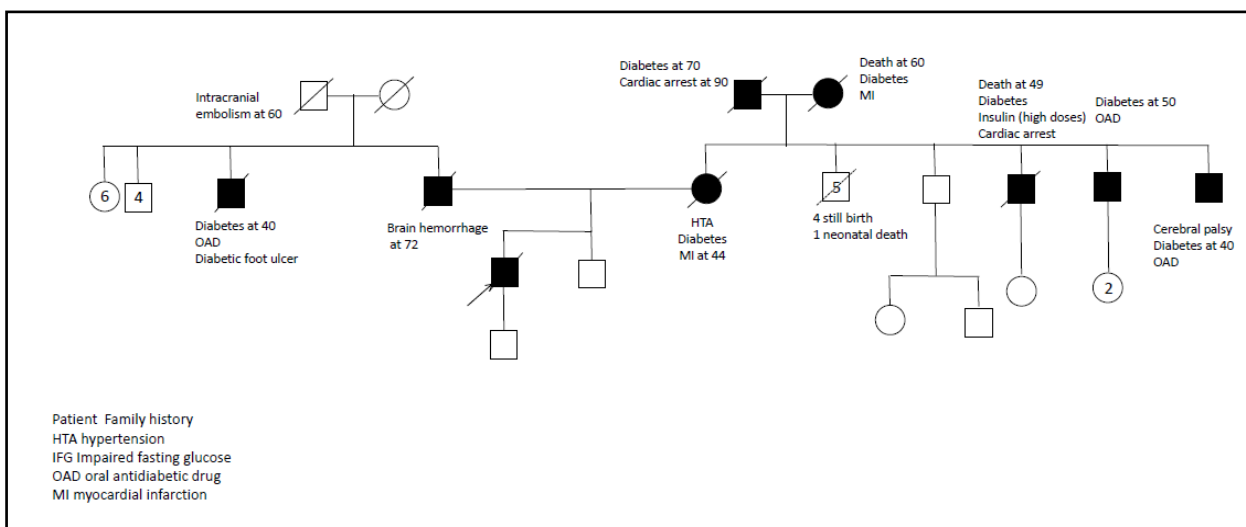
A) Photographs from patient 1 showing central/android shape obesity with fat accumulation in facial and supraclavicular region, and cushingoid morphotype. B) Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) showing body fat distribution and the percentage of fat mass compared to the reference curve. C) Abdominal CT scan confirming the presence of a little amount of

subcutaneous adipose tissue (SAT) (superficial and deep), and an excessive accumulation of visceral adipose tissue (VAT).

Cardiac investigations revealed severe coronary artery disease and concentric left ventricular hypertrophy with preserved ejection fraction (> 60 %), and no cardiac rhythm nor conduction disturbances. Hormonal investigations ruled out the diagnosis of polycystic ovarian syndrome and Cushing syndrome. Leptin was measured at 39.3 ng/mL (reference 3.3-8.7) and adiponectin at 1.34 µg/mL (reference 3.8-11.8). Liver enzymes were in the normal range but abdominal echocardiography revealed diffuse hepatic steatosis. The patient underwent bariatric surgery because of severe obesity with multiple comorbidities and because she failed losing weight with life style modifications. She had a sleeve gastrectomy in 2016. At one year, she had left 14 kilos (42 percent excess weight lost (%EWL) and we could divide her insulin doses by three. Nevertheless, she regained weight at 24 months (+6 kilos, %EWL 24%), and we had to increase her insulin doses again. Hypertension and hypertriglyceridemia persisted after surgery and required the continuation of lipid lowering (Atorvastatine 80) and antihypertensive drugs (bitherapy). Hepatic steatosis remained after intervention, but sleep apnea syndrome improved (apnea hypopnea index decreased from 27 to 16 per hour).

This patient carries the mutation c.1892G>A (p.Gly631Asp). This mutation has been recorded only twice in European patients (frequency in gnomAD: 8.037.10⁻⁶) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) with no clinical data available. The variant has the reference number rs267607648 and is predicted to be pathogenic by several bioinformatics tools (<http://umd-predictor.eu/>) [21].

Patient 2 is a 45 years-old man treated with high insulin doses (100 UI/day) for diabetes mellitus diagnosed at 34, complicated with non-proliferative retinopathy and microalbuminuria. He also suffered from hypertriglyceridemia (from 5.46 mmol/L to 13.45 mmol/L) despite high dose of statins (Rosuvastatin). Leptin was measured at 8.49 ng/mL (reference 3.3-8.7). He had a family history with diabetes mellitus (Figure 3). His mother was diabetic and died of myocardial infarction at 44 and his father died of brain hemorrhage at 72. On his mother's side, diabetes mellitus was described for his grand-parents and 3 uncles (Figure 3).



Physical examination revealed a BMI = 26.5 kg/m², WC = 107 cm with no lipodystrophy but the patient complaint about muscular cramps (Figure 4). The mean subcutaneous adipocyte diameter was 109.9 ± 24.3 μm. The GAD and IA-2 antibodies and MODY testing were negative. Abdominal echocardiography revealed liver steatosis and hepatomegaly (right hepatic arrow at 20cm). Myocardial evaluation did not reveal a cardiac or coronary artery disease. The exercise test was normal.

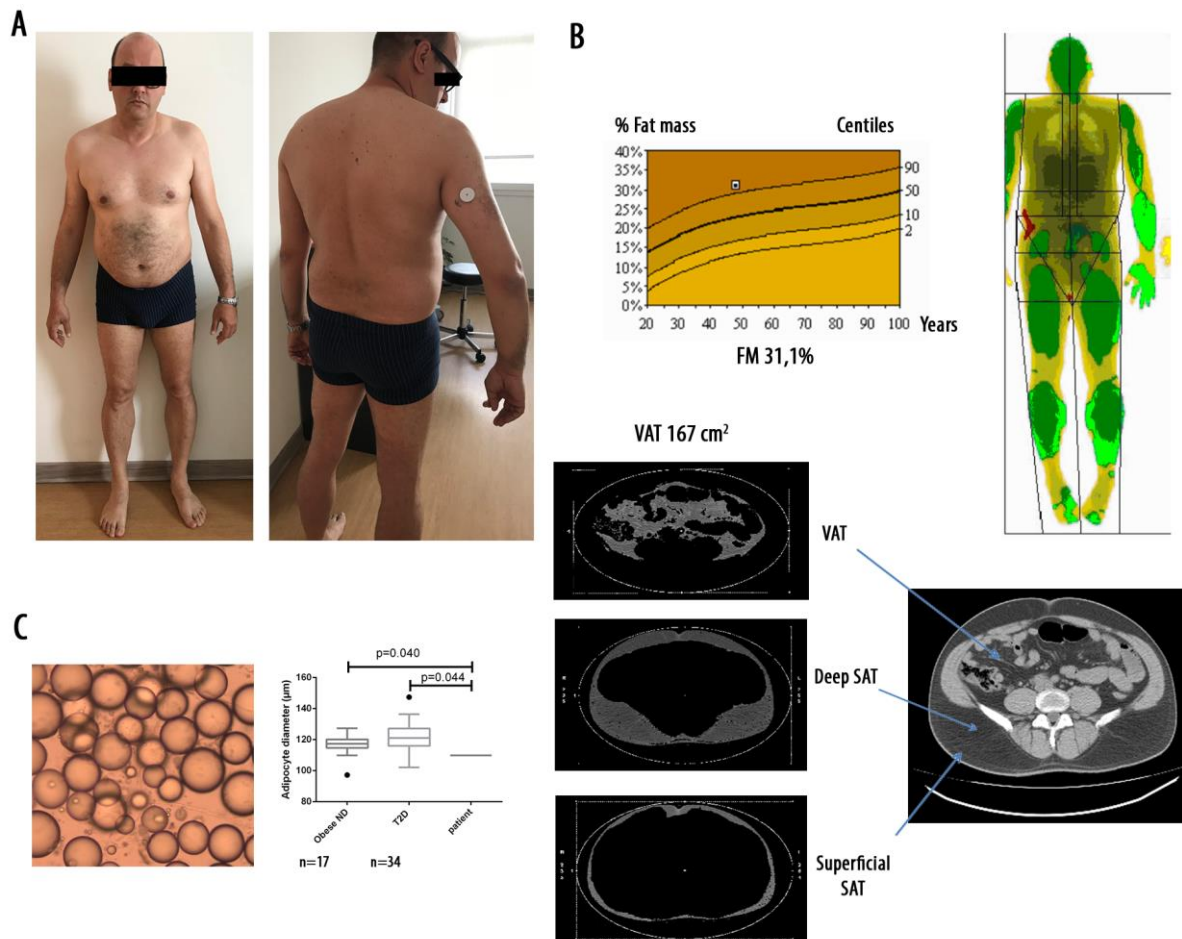


Figure 4: Patient 2 metabolic phenotype. A) Photographs of patient 2 showing no lower limb lipoatrophy but a high waist circumference. B) DEXA showing body fat distribution and the moderate excess of fat mass (31.1%) compared to the reference curve. Abdominal CT scan confirming the presence of an excess of deep subcutaneous fat. C) Needle fat biopsy showing smaller adipocytes than a matched for age sex and BMI obese non diabetic (ND) and a type 2 diabetic population.

The molecular analyses highlighted a heterozygous missense mutation in *LMNA* gene: c.1745G>T (p.Arg582Leu). The variant was found on three patients on gnomAD database (frequency in gnomAD: $1.095 \cdot 10^{-5}$) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) and is predicted to be pathogenic by several predictive tools (<http://umd-predictor.eu/>).

Patient cells functional analysis

To perform functional analysis, experiments were achieved using fibroblasts taken from patient's skin. First, we evaluated the replication profile of each patient's cell. To do so, we quantified cells BrdU incorporation. As shown in figure 5A, BrdU level was significantly lower in patients cells compared to control cells showing an altered replication capacity for the two patients cells.

Experiments testing the production of beta-galactosidase have been achieved with the patients. The results showed a significantly higher rate of beta-galactosidase indicating increased senescence for patient 1 only. (Figure 5A).

We also analyzed nuclear shape of patient fibroblast as nuclear misshaping is a well described phenotype associated with premature senescence [22]. Interestingly, we observed a 2-fold increase of the percentage of cells showing nuclear anomalies such as misshape nuclei or nuclear membrane blebbing (Figure 5C). Altogether, these observations suggested that *LMNA* mutations observed in both patients could lead to phenotypes associated to premature aging.

To test our hypothesis, we first evaluated the effect of Lamin A down-expression on nuclear morphology. We transfected patient cells with a siRNA specifically targeting the 3'UTR *LMNA* transcript and inducing a significant decrease of Lamin A level expression. While the *LMNA*-specific siRNA didn't induce significant effect in control cells, it leads to a decrease of the percentage of patients cells showing nuclear anomalies (Figure 5B). In a second time, we evaluated the effect of *LMNA* mutant's overexpression on nuclear morphology in control cells. To do so, we transfected plasmids expressing control or *LMNA* mutants carrying patient 1 or 2 mutations. As expected, a higher level of nuclear abnormalities was observed in cells expressing both *LMNA* mutants showing that the two mutations in *LMNA* induced misshapen nuclei (Figure 5C).

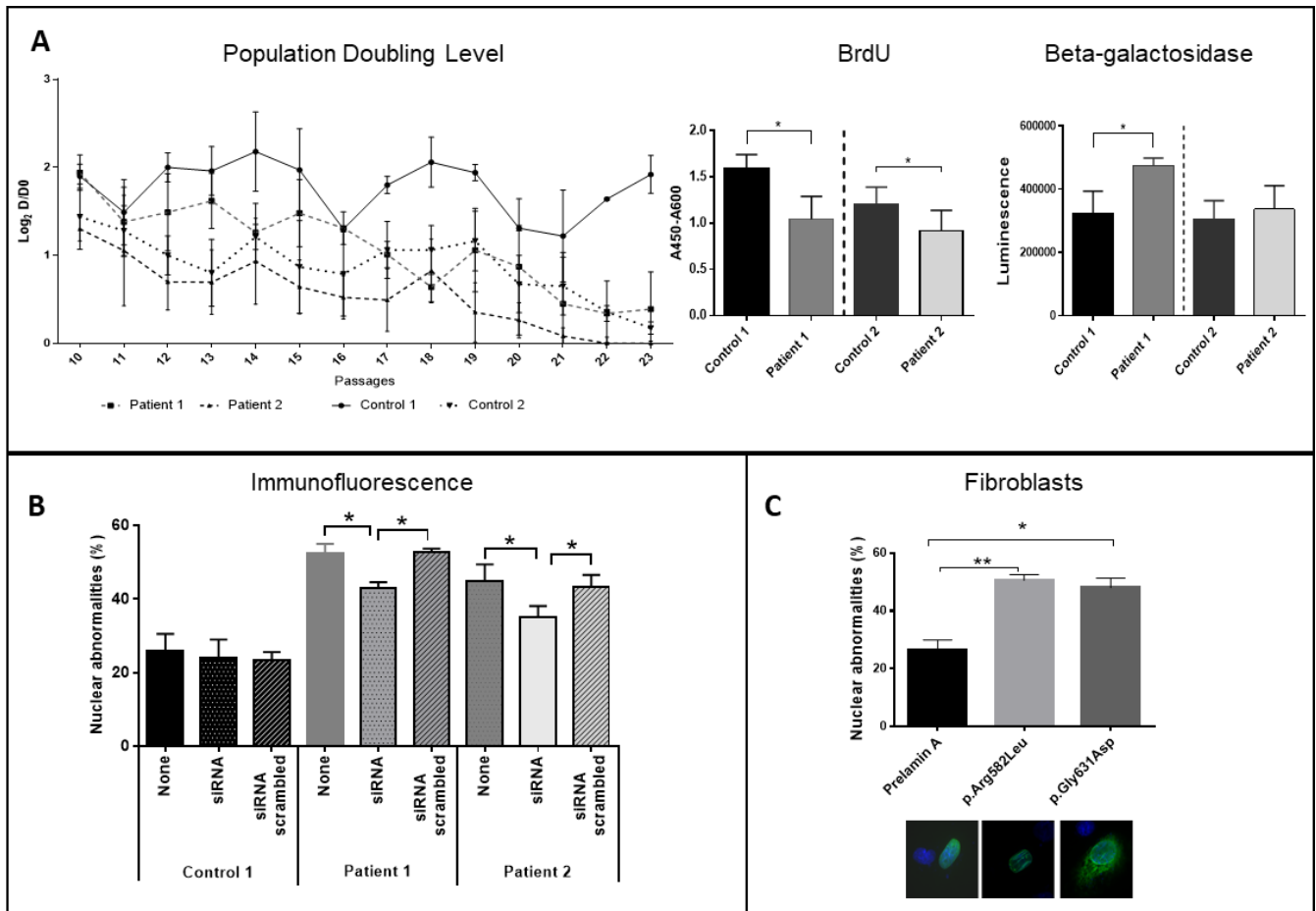


Figure 5:

A) Left panel: Population doubling level of controls cells and patients cells. Central panel: BrdU incorporation of controls and patients cells. Right panel: Senescence associated to beta-galactosidase production. B) Percent of nuclear shape anomalies counted by immunofluorescence in control (in black) and patients (in grey) cells with or without the use of siRNA. C) Percent of nuclear shape anomalies after transfection of control fibroblasts with plasmids expressing either WT prelamin A (in black) or the mutations carried by the patients (in grey). In these experiments, controls correspond to fibroblasts from healthy donors. Asterisk correspond to significant p values lower than 0.05. Representative pictures of normal and abnormal nuclei staining with DAPI and lamin A/C were taken on Axioplan 2 imaging (Zeiss) under oil immersion (100x magnification) and worked with Axiovision software.

Discussion

HGPS, MAD-A and tissue-specific laminopathies inducing cellular senescence, nuclear abnormalities and metabolic dysfunctions strengthen the importance of lamins in metabolic diseases.

We showed here that 2 mutations in *LMNA* associated with severe metabolic phenotype induce alterations in shape nuclei and cellular premature senescence.

The patients carry mutations in the C-tail specific domain of lamin A, consequently lamin C is not affected. Here, the phenotype induced by the mutation p.Gly631Asp (exon 11) seems clinically more severe than the one associated with mutation p.Arg582Leu (exon 11). The patient did not lose expected weight loss after bariatric surgery and metabolic abnormalities remained despite important caloric restriction induced by sleeve gastrectomy. This clinical observation has been confirmed by the functional studies showing a stronger cellular senescence and defects for the patient 1. This could be explained either because of the mutation's nature in itself or by the fact that women are generally more markedly affected in genetic lipodystrophy than men.

Only a few cases of MS linked to *LMNA* mutations have been reported up to now, suggesting that this condition, given the high proportion of patients with MS or metabolic abnormalities with early onset, is under-diagnosed [5,13,14,23].

Moreover, a recent study based on the analysis of variants frequencies in several public databases (n=60 706 unrelated individuals) revealed an unexpected high number of *LMNA* variants (n=132), including novel variants predicted to perturb lamin A assembly or function, of which variant p.G602S that was identified as a potential risk factor for type 2 diabetes mellitus in African Americans [24].

It is particularly important to pay attention to metabolic derangements induced by *LMNA* mutations because a specific clinical follow up and therapeutic approaches can be set up for these patients as mentioned in the multi-society practice guidelines published in 2016 that could improve this very specific condition [3].

Furthermore, an anticipation of metabolic complications over three generations of patients carrying mutated *LMNA* has been described, such as hypertriglyceridemia which appeared 15 years earlier in the second generation, highlighting the importance of pre-symptomatic genetic diagnosis [25]. Finally, one important finding of this work was the persistence of subcutaneous adipose tissue, with small adipocytes, which was consistent with the measurable serum leptin level that could make the diagnosis harder, extending the pattern of *LMNA* associated phenotypes.

Conclusions

Our work showed that two heterozygous missense mutations in *LMNA* are associated with severe metabolic alterations such as hypertriglyceridemia and insulin resistance which are the cause of premature senescence at cellular level. Future studies are needed to define which patient should be genetically screened, as we thought this condition might be under-diagnosed, given the high prevalence of metabolic diseases worldwide. Further studies in human of *LMNA* variants may provide insights necessary to understanding the many mechanisms and pathways by which A-type lamins influence metabolism.

Acknowledgments

The authors warmly thank the patients who participated in this study.

Author Contributions

CD and BG wrote the manuscript; CB, NL and AD contributed to the discussion and reviewed the manuscript; CD, DG, AV and FM performed the functional studies of senescence; BG, CV and AD collected the clinical data, PB, CD and NBP performed the directed mutagenesis.

References

1. Hussain, I.; Garg, A. Lipodystrophy Syndromes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2016**, *45*, 783–797.
2. Fardet, L.; Vigouroux, C.; Capeau, J. [Lipodystrophies]. *Rev. Med. Interne* **2013**, *34*, 614–622.
3. Brown, R.J.; Araujo-Vilar, D.; Cheung, P.T.; Dunger, D.; Garg, A.; Jack, M.; Mungai, L.; Oral, E.A.; Patni, N.; Rother, K.I.; et al. The Diagnosis and Management of Lipodystrophy Syndromes: A Multi-Society Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 4500–4511.
4. Vatier, C.; Bidault, G.; Briand, N.; Guenantin, A.-C.; Teyssieres, L.; Lascols, O.; Capeau, J.; Vigouroux, C. What the genetics of lipodystrophy can teach us about insulin resistance and diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **2013**, *13*, 757–767.
5. Decaudain, A.; Vantyghem, M.-C.; Guerci, B.; Hécart, A.-C.; Auclair, M.; Reznik, Y.; Narbonne, H.; Ducluzeau, P.-H.; Donadille, B.; Lebbé, C.; et al. New metabolic phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 4835–4844.
6. Vantyghem, M.C.; Vincent-Desplanques, D.; Defrance-Faivre, F.; Capeau, J.; Fermon, C.; Valat, A.S.; Lascols, O.; Hecart, A.C.; Pigny, P.; Delemer, B.; et al. Fertility and obstetrical complications in women with LMNA-related familial partial lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 2223–2229.
7. Garg, A. Lipodystrophies. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 143–152.
8. Guillín-Amarelle, C.; Fernández-Pombo, A.; Sánchez-Iglesias, S.; Araujo-Vilar, D. Lipodystrophic laminopathies: Diagnostic clues. *Nucl. Austin Tex* **2018**, *9*, 249–260.
9. Mounkes, L.; Kozlov, S.; Burke, B.; Stewart, C.L. The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, *13*, 223–230.
10. Ahmed, M.S.; Ikram, S.; Bibi, N.; Mir, A. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Mol. Neurobiol.* **2017**.
11. Vigouroux, C. [Laminopathies: lipodystrophies, insulin resistance, syndromes of accelerated ageing... and others]. *Ann. Endocrinol.* **2005**, *66*, 270–278.
12. Gonzalo, S.; Kreienkamp, R.; Askjaer, P. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *33*, 18–29.
13. Galant, D.; Gaborit, B.; Desgrouas, C.; Abdesselam, I.; Bernard, M.; Levy, N.; Merono, F.; Coirault, C.; Roll, P.; Lagarde, A.; et al. A Heterozygous ZMPSTE24 Mutation Associated with Severe Metabolic Syndrome, Ectopic Fat Accumulation, and Dilated Cardiomyopathy. *Cells* **2016**, *5*.
14. Dutour, A.; Roll, P.; Gaborit, B.; Courrier, S.; Alessi, M.-C.; Tregouet, D.-A.; Angelis, F.; Robaglia-Schlupp, A.; Lesavre, N.; Cau, P.; et al. High prevalence of laminopathies among patients with metabolic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 3779–3786.
15. Vigouroux, C.; Auclair, M.; Dubosclard, E.; Pouchelet, M.; Capeau, J.; Courvalin, J.C.; Buendia, B. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 4459–4468.
16. Muchir, A.; Medioni, J.; Laluc, M.; Massart, C.; Arimura, T.; van der Kooij, A.J.; Desguerre, I.; Mayer, M.; Ferrer, X.; Briault, S.; et al. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from

- patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve* **2004**, *30*, 444–450.
17. De Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Cau, P.; Navarro, C.; Amiel, J.; Boccaccio, I.; Lyonnet, S.; Stewart, C.L.; Munnich, A.; Le Merrer, M.; et al. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **2003**, *300*, 2055.
 18. Cau, P.; Navarro, C.; Harhouri, K.; Roll, P.; Sigaudy, S.; Kaspi, E.; Perrin, S.; De Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N. Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *29*, 125–147.
 19. Bonello-Palot, N.; Simoncini, S.; Robert, S.; Bourgeois, P.; Sabatier, F.; Levy, N.; Dignat-George, F.; Badens, C. Prelamin A accumulation in endothelial cells induces premature senescence and functional impairment. *Atherosclerosis* **2014**, *237*, 45–52.
 20. Grundy, S.M.; Cleeman, J.I.; Daniels, S.R.; Donato, K.A.; Eckel, R.H.; Franklin, B.A.; Gordon, D.J.; Krauss, R.M.; Savage, P.J.; Smith, S.C.; et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit. Pathw. Cardiol.* **2005**, *4*, 198–203.
 21. Salgado, D.; Desvignes, J.-P.; Rai, G.; Blanchard, A.; Miltgen, M.; Pinard, A.; Lévy, N.; Collod-Bérout, G.; Bérout, C. UMD-Predictor: A High-Throughput Sequencing Compliant System for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution. *Hum. Mutat.* **2016**, *37*, 439–446.
 22. Caron, M.; Auclair, M.; Donadille, B.; Bereziat, V.; Guerci, B.; Laville, M.; Narbonne, H.; Bodemer, C.; Lascols, O.; Capeau, J.; et al. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1759–1767.
 23. Ambonville, C.; Bouldouyre, M.-A.; Laforêt, P.; Richard, P.; Benveniste, O.; Vigouroux, C. [A complex case of diabetes due to LMNA mutation]. *Rev. Med. Interne* **2017**, *38*, 695–699.
 24. Florwick, A.; Dharmaraj, T.; Jurgens, J.; Valle, D.; Wilson, K.L. LMNA Sequences of 60,706 Unrelated Individuals Reveal 132 Novel Missense Variants in A-Type Lamins and Suggest a Link between Variant p.G602S and Type 2 Diabetes. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 79.
 25. Jeru, I.; Vazier, C.; Vantyghem, M.-C.; Lascols, O.; Vigouroux, C. LMNA-associated partial lipodystrophy: anticipation of metabolic complications. *J. Med. Genet.* **2017**, *54*, 413–416.

III. Revue : *LMNA* mutations associated with atypical lipodystrophic syndrome (Manuscrit en préparation)

LMNA mutations associated with atypical lipodystrophic syndrome

Sommaire

I.	Introduction.....	2
A.	Lamins.....	2
1.	Post-translational modifications of lamins	2
2.	Lamins structure	3
3.	Lamins roles	3
a.	Genomic stability	3
b.	Nuclear stiffness.....	4
c.	Mechanotransduction	4
d.	Cell cycle	5
e.	Telomeres and lamins	5
f.	Chromatin organization	5
II.	LAMINOPATHIES	7
A.	Multi-systemic laminopathies	7
1.	Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome.....	7
2.	Restrictive Dermopathy	8
3.	Mandibulo-acral Dysplasia.....	8
4.	Other <i>LMNA</i> aging related diseases.....	9
B.	Tissue-specific laminopathies	9
1.	Skeletal-muscle laminopathies	9
a.	Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy type 2	9
b.	Limb-girdle Muscular Dystrophy type 1B.....	10
c.	<i>LMNA</i> Muscular Dystrophy.....	10
2.	Charcot Marie Tooth disease (CMT).....	10
3.	Dilated cardiomyopathy:	11
III.	Dunnigan Syndrome.....	12
A.	Description	12
B.	Clinical and biological observations	13
C.	Differential diagnosis	14
IV.	Atypical familial partial lipodystrophy	17
A.	Insulin resistance syndrome	17
B.	Metabolic syndrome	18
C.	Metabolic laminopathies	19
V.	Adipose tissue alteration and <i>LMNA</i> mutations.....	21
VI.	References	24

I. Introduction

A. Lamins

Nuclear lamina is a tridimensional fibrillar meshwork located under the nuclear envelope of every eukaryotic cell. It's mainly composed by lamins and lamin-associated proteins embedded in the nuclear envelope (Aebi et al. 1986; Choi et Worman 2014).

Lamins belong to the intermediate filaments superfamily and constitute the type V, the nuclear subgroup. Two types of lamins exist, which differ according to their sequence homology and biochemical properties (Navarro, Cau, et Lévy 2006). B-type lamins are encoded by LMNB1 and LMNB2 genes producing major isoforms lamin B1 (LMNB1), lamin B2 and minor isoform lamin B3 only expressed in germinal cells (LMNB2) (Elkhatib et al. 2015). B-type lamins are embedded to the nuclear envelope by a farnesyl hydrophobic group (Broers et al. 2006). On the other hand, *LMNA* gene encodes different A-type lamins via alternative splicing: major isoforms lamin A and lamin C, and minor isoforms lamin A Δ 50 and lamin C2. A-type lamins are soluble in the nuclei (Cau et al. 2014; Scaffidi et Misteli 2006; Dechat et al. 2010).

While lamin C is translated in its mature form, the lamins A, B1 and B2 are translated as prelamins which undergo several steps of post translational maturation (McClintock et al. 2007).

1. Post-translational modifications of lamins

Different types of lamins possess at their C-terminal end a 4 amino acid sequence, CAAX (C: cysteine; A: aliphatic amino acid; X: any amino acid), allowing post-translational maturation. Through this sequence, prelamins are farnesylated on the Cysteine residue and AAX tripeptide is removed by cleavage with ZMPSTE24 enzyme. The hydrophobic farnesyl group act as an anchor to keep prelamins attached to the phospholipid bilayers. Then, Cysteine is then carboxy-

methyated by isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). While lamin B are released as farnesylated mature forms, prelamin A only undergoes a final post translational step deleting the last 15 amino acids at C-terminal end (including the farnesylated cysteine) leading to the soluble mature lamin A form (Cau et al. 2014; Dittmer et Misteli 2011; Navarro, Cau, et Lévy 2006).

2. Lamins structure

Lamins are composed by a globular head domain at N-terminal end and a C-terminal tail domain separated by a rod domain. C-terminal end is compound by 4 α helical domains (1A, 1B, 2A and 2B) dissociated by a linker region (L1, L12 and L2). C-terminal part also contains Ig fold domain, NLS signal and is ended by specific motif CaaX (Krimm et al. 2002; Dhe-Paganon et al. 2002). To form intermediate filaments, lamins form longitudinally dimers and polymers by head to tail association. Polymer interactions lead to protofilaments and intermediate filaments by antiparallel association (Scaffidi et Misteli 2006; Dittmer et Misteli 2011).

3. Lamins roles

a. Genomic stability

Eukaryotic cells developed mechanisms permitting to correct DNA lesions induced by endogenous or exogenous factors. Recent studies illustrated the role of lamins in DNA damage response (Kakarougkas et Jeggo 2014). Double strand breaks are repaired mostly by NHEJ and HR systems (Shibata et al. 2011). Lamin A has been involved indirectly in both mechanisms. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) *LMNA*^{-/-} showed disruption of NHEJ underscored by 53BP1 depletion (Gonzalez-Suarez et al. 2009). Thus, NHEJ system is requested by 53BP1 and revealed a disruption of HR system mediated by Rad51 and 53BP1 depletion. These studies highlight the indirect effects of lamins (Redwood et al. 2011). Broadly, defects in DNA damage

response linked with lamins are hardly understandable due to the fact that mutations in lamins induce numerous defects and diseases (see below) (Redwood et al. 2011).

b. Nuclear stiffness

Biochemical analyses and force transmission experiments realized on different cell types allowed to characterize lamins properties. B-type lamins have elastic properties and play a role in nucleus deformation. On the other hand, A-type lamins increase nuclear stiffness and reduce nuclear plasticity. Thus, nuclear properties can be expressed by lamin A / lamin B ratio and determined the viscoelastic properties of the different cell types. Noticeably, in differentiated cells, the important proportion of lamin A parallels the stiffness of nucleus and decrease of cell replication rate. While in circulating cells and low differentiated cells, lamin B are more expressed, allowing nuclear deformation and increase cell replication rate (Swift et al. 2013; Schuldt 2013).

c. Mechanotransduction

Lamins play a role in the force transmission from extracellular matrix to nucleus via cytoskeleton and nucleoskeleton and contributes to mechanotransduction. The relation between cytoplasm and nucleus is allowed by the LINC (LInker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton) complex (Horn 2014). LINC is composed by nesprins and SUN proteins which respectively bind the cytoskeleton and lamins. Recent studies showed that the external physical constraints applied on cells lead to modification of lamins levels and biophysical properties of the nucleus (Uhler et Shivashankar 2017). More interestingly, lack of lamins and lamins-associated protein as emerin attenuate mechanical stress induced signaling and modify the mechanotransduction response (Sosa et al. 2012; Tapley et Starr 2013). Other studies highlight the role of the mechanotransduction signal on the chromatin remodeling and regulation of transcription factors activity (Yang et al. 2013).

d. Cell cycle

During mitosis, nuclear envelope and nuclear lamina dislocate to allow chromosomal DNA to be split into the two daughter cells. During this process, lamins undergo post translational modifications leading to hyperphosphorylation state induced by cyclin dependent kinases (Cdk). Cdk phosphorylate serine and threonine residues of both the head and tail domains of the protein leading to protofilaments and polymers disruption (Machowska, Piekarowicz, et Rzepecki 2015). Lamin A and C are soluble during the process while lamin B are embedded with nuclear envelope forming small vesicles (Torvaldson, Kochin, et Eriksson 2015). During telophase, nuclear envelope reassembles because lamins are dephosphorylated through the action of PP1 protein (Protein phosphatase 1) and form complex structures progressively restoring the nuclear envelope and lamina (Heald et McKeon 1990).

e. Telomeres and lamins

Telomere shortening is a physiological process due to aging that leads to an increase of DNA defects and cellular senescence (Blackburn, Epel, et Lin 2015). Cellular growth may be possible by inhibition of tumor suppressor factors implying genomic instability (Gonzalo et Eissenberg 2016). Studies highlight connections existing between lamins and proteins responsible for telomere replication. These interactions control the telomeres motility and metabolism (De Vos et al. 2010). Lamin A defects increase telomeres motility and lead to impaired cell growth and telomere attrition (Raz et al. 2008).

f. Chromatin organization

Since 1990s, studies on *Drosophila* showed direct interactions between lamins and chromatin (Li et Zhu 2015). However molecular mechanisms and their role in gene expression remained unknown until recent discoveries. Chromatin organizes according to gene poor chromosome territories which localized at nuclear periphery are and gene rich rather at the center of the nucleus. This organization is highly labile and depends mostly on the cell type and cell's

activity. The link between lamins and chromatin has been highlighted using DamID technology which showed chromatin domains associated with nuclear lamina, so called “LADs”. There are between 1000 and 1500 LADs covering one third of the genome. LADs correspond to poor gene regions with repressive histone marks and are regulated by insulator CTCF (Guelen et al. 2008). Interestingly, genome-wide DamID maps of different lamins showed similar results. Being soluble, lamin A is found in nuclear periphery as well as in the center of the nucleus. Nevertheless, other studies showed direct interactions between lamin A and chromatin at nuclear interior (van Steensel et Belmont 2017).

In 2013, Solovei & al. shed a light on the role of lamin A and LBR. Thus, LBR and lamin A expression are variable according to the stage of cell differentiation. At early stages, LBR is predominantly expressed while lamin A is rather found in differentiated cells. Interestingly, LBR and lamin A are tethered with heterochromatin and repress gene expression of specific chromatin regions according to cell stages. LBR and lamin A double knockout leads to chromatin “inversion”. Heterochromatin becomes located at the center of the nucleus and euchromatin at periphery (Solovei et al. 2013). These studies highlight the role of LBR and lamin A on chromatin territories and gene expression. The interactions between lamins and chromatin reveal the complexity of the chromatin organization (Shimi et al. 2008).

II. LAMINOPATHIES

Over the past decades, *LMNA* mutations have been reunited in the so-called “laminopathies”. More than 15 different pathologies have been described including mutations in ZMPSTE24, the gene encoding one of the enzymes responsible for lamins post-translational maturation. We can describe two major groups of pathologies. Multi-systemic laminopathies, or progeroid syndromes lead to multiple tissue malfunctions and premature aging and span from severe forms (DR, HGPS) to milder forms (MAD). Tissue-specific laminopathies induce single tissue defects and so can affect skeletal-muscle, cardiac tissue, peripheral nerve and adipose tissue (Cau et al. 2014).

A. Multi-systemic laminopathies

1. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome

The first cases of Hutchinson-Gilford Progeria syndrome (HGPS) have been described at the end of the 19th century by Dr Hutchinson and Gilford respectively in 1886 and 1897 (Hutchinson 1886; Gilford 1897). HGPS is a very rare genetic disorder characterized by premature aging. The prevalence is estimated to 1 over 20 million individuals. Clinical features appear with early onset (~2 years old) and are characterized first by the loss of skin elasticity, high-pitched voice, alopecia and growth retardation (Ahmed et al. 2017). Later, patients display scleroderma, bones alterations (osteoporosis, osteolysis), amyotrophy and lipodystrophy. Metabolic disorders are marked by diabetes mellitus and abnormal lipid profile. Characteristic facial dysmorphic traits as micrognathia, prominent scalp veins, beaked nose are observed (Gordon et al. 2014). Cognitive functions are preserved. Death occurs towards 14 years old and is due mainly to cardiac infarction (Muchir et Worman 2010).

In 2003, de novo mutations in *LMNA* gene were identified as responsible for HGPS (De Sandre-Giovannoli et al. 2003; Eriksson et al. 2003). One recurrent mutation: *LMNA*: c.1824C>T (p.Gly608Gly), located in exon 11, leads to abnormal splicing due to activation of a cryptic

donor site which creates a truncated protein called “progerin”, on an autosomic de novo dominant inheritance mode. Progerin doesn't contain the sequence recognized by ZMPSTE24 metalloprotease and remains abnormally farnesylated at the C-terminal end, leading to its abnormal persistence at the nuclear periphery (Scaffidi et Misteli 2006).

At cellular level, progerin incorporation in the nuclear lamina causes numerous toxic effects in the nuclear envelope structure and the nucleus functions. Primary fibroblasts from patients showed decrease of cellular proliferation, accelerated senescence and nuclei abnormalities underscoring defects of the nuclear envelope (Navarro, Cau, et Lévy 2006). HGPS in vitro experiments also exhibit telomeres attrition, DNA repair mechanisms defects, mitochondrial dysfunctions and loss of peripheral chromatin and repressive chromatin marks (Manju, Muralikrishna, et Parnaik 2006; López-Otín et al. 2013). These numerous cellular defects contribute to explain the severity of HGPS clinical symptoms.

2. Restrictive Dermopathy

Restrictive dermopathy is due to ZMPSTE24 homozygous missense mutation leading to inactivation of the protein. Clinically, patients present severe skin involvement and reduced movements. The patients die few days after birth (Navarro et al. 2004). A total absence of prelamin A post-translational processing is thus more severe than the effect of a mutated *LMNA* allele.

3. Mandibulo-acral Dysplasia

Mandibuloacral dysplasia has been associated with *LMNA* mutations and leads to a milder form of laminopathy characterized by bone alterations, lipodystrophy and premature aging. First clinical features appear between 2 and 5 years and signs of premature aging emerge towards 20 years old (Cunningham et al. 2010). Clinically, patients present skin abnormalities, facial dysmorphic traits and skeletal alterations distinguished by osteolysis and joints stiffness. Lipodystrophy is marked by lower limb lipodystrophy, adipose tissue hypertrophy localized on

the neck and the trunk and is accompanied by metabolic disorders such as diabetes mellitus or hypertriglyceridemia (Vittoria Cenni et al. 2018; Capanni et al. 2005). Interestingly, MAD doesn't affect cardiac tissue and skeletal-muscle. At cellular level, different experiments show nuclear abnormalities, loss of peripheral chromatin, nuclear lamina thickening and dysregulated stress response (Vittoria Cenni et al. 2018).

Another form of MAD has been associated to ZMPSTE24 mutations (Agarwal et al. 2003). The pathology share the same characteristic as MAD-A. Nevertheless, MAD-B is more severe and can be distinguish by generalized lipodystrophy, renal glomerulonephritis and pronounced micrognathia.

4. Other LMNA aging related diseases

Recently, new syndromes related with premature aging has been described involving *LMNA* mutations and are referred as atypical progeria syndromes. Missense mutations lead to the production of prelamin A with either autosomal dominant, either autosomal recessive pattern of inheritance (Doubaj et al. 2012).

Interestingly, Nestor-Guillermo Progeria Syndrome has been associated with *BANF1* homozygous mutations. *BANF1* is embedded in the nuclear envelope and is a lamin A direct partner. The phenotype is a milder form of laminopathy and thus shares common features with HGPS (Cabanillas et al. 2011).

B. Tissue-specific laminopathies

1. Skeletal-muscle laminopathies

a. Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy type 2

In 1999, *LMNA* mutations were associated with Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) (G. Bonne et al. 1999). The pattern of inheritance is mostly autosomal dominant even though recessive transmission and mosaicism have been described for severe phenotype in rare cases

(Gisèle Bonne et Quijano-Roy 2013). The onset is between 20 and 30 years and the patients present clinically a triad: scapula peroneal muscular weakness, joints contractures (elbow, ankle, spine) and cardiac defects (dilated cardiomyopathy, ventricular tachyarrhythmia) (Puckelwartz et McNally 2011; G. Bonne et al. 1999).

b. Limb-girdle Muscular Dystrophy type 1B

Limb-girdle muscular dystrophy type 1B constitutes the second phenotype described with *LMNA* mutations with autosomal dominant pattern of inheritance. The adult onset occurs between 30 and 40 years old. The muscular weakness located at the pelvic and the scapular girdle predominates, accentuates later to the distal muscles and can be associated to cardiac defects (Wicklund et Kissel 2014).

c. LMNA Muscular Dystrophy

LMNA MD is the most severe and completes the spectrum of muscular dystrophies associated with laminopathies. The early onset (2 years old) allows the diagnosis (D'Amico et al. 2005). The follow-up can be determined by muscular biopsies and an increased serum level of creatine kinase (Mercuri et al. 2004). One can distinguish two subgroups: a severe form characterized by poor motor development and spontaneous movements complicated by respiratory failure; and a milder form with a progressive decrease of cervical muscular strength (Quijano-Roy et al. 2008).

2. Charcot Marie Tooth disease (CMT)

LMNA mutations are involved in inherited neuropathies described in one form of Charcot Marie-Tooth disease (De Sandre-Giovannoli et al. 2002). In 1999, a homozygous mutation (R298C) has been associated to axonal form of the disease with normal motor median nerve conduction velocity in consanguineous Algerian family (Bouhouche et al. 1999). Despite the onset of CMT2B1 around the second decade of life, the interfamilial and intrafamilial phenotypic variability leads to a different evolution of the pathology (Jerath et Shy 2015).

3. Dilated cardiomyopathy:

Despite some 60 mutations already described, 6% of inherited DCM are associated with *LMNA* mutations (Schreiber et Kennedy 2013; Fatkin et al. 1999; Haas et al. 2015). The pattern is autosomal dominant and the chance to develop DCM ranged to 66% between 20 to 40 years old and reach 100% completing 60th years of age. Otherwise, *LMNA* mutations can induce overlapping syndrome leading to cardiac defects associated with either fat distribution anomalies, or either muscular dystrophies (Captur et al. 2017).

III. Dunnigan Syndrome

A. Description

Type 2 familial partial lipodystrophy or Dunnigan syndrome are induced by missenses heterozygous or compound heterozygous mutations in *LMNA* gene. *LMNA* mutations are mainly located in exon 8 and exon 11 (Hegele 2000; C. Vigouroux et al. 2000; Speckman et al. 2000). The *LMNA* mutations p.R482W/Q lead to 80% of FPLD2 phenotype and describe the classical form of the disease (Broers et al. 2006). However, numerous mutations are also reported all along *LMNA* gene (Guillín-Amarelle et al. 2018).

FPLD2 is clinically defined by abnormal fat distribution starting around puberty characterized by lipotrophy and fat accumulation (Dunnigan et al. 1974; Hegele 2000). Lipotrophy is localized in the limbs, the hips and the buttocks leading to a protruding and well-defined musculature whereas fat accumulation is lied in the neck, the face and the dorsal and axillary region. The abnormal fat distribution induces android appearance. Patients also displays frequently phlebomegaly in the upper and the lower limbs, lipomas and acanthosis nigricans in the neck and axillary region related to diabetes mellitus (Abhimanyu Garg 2004). Less frequently, patients can feature amyotrophy or muscular hypertrophy (Corinne Vigouroux et al. 2018).

The women present an android appearance and precocious metabolic disorders accompanied with gynecological disorders as PCOS (Polycystic ovary syndrome), miscarriage, still birth and gestational diabetes. Men display less severe biological and clinical disorders making difficult diagnosis (M. C. Vantyghem et al. 2008). Men are often diagnosed via close relatives.

Patients present cardiac, metabolic, cardiovascular, hepatic and pancreatic comorbidities due mainly to metabolic disorders. Indeed, insulin resistance appears early as well as hypertriglyceridemia and low HDL-Cholesterol level (Lüdtke et al. 2005). The appearance of

metabolic complications can be improved by specific diet and healthy life style. Hence, abnormal fat distribution combined with diabetes mellitus and hypertriglyceridemia escalate the specific comorbidities. Hepatic steatosis is frequent and associated with slight increase aminotransferase plasma levels (ALAT, ASAT) (Lüdtke et al. 2005). Few cases also display hepatic cirrhosis that can be induced by environmental factors and metabolic complications associated with FPLD2 (Hussain et Garg 2016).

Numerous cases present cardiovascular diseases such as valvulopathies, hypertrophic cardiomyopathies and rhythm disturbances. Cardiovascular diseases appear according to the patient's age and the severity of metabolic complications leading to an anticipation phenomenon (Muschke et al. 2007; van Tintelen et al. 2007).

Notably, Dunnigan syndrome exhibits low or subnormal serum leptin level. Leptin, produced by adipose tissue, induces satiety and regulates the energy balance. Thus, hyperphagia is frequent in FPLD2. Nowadays, serum leptin level is used as diagnosis criteria and a pharmacological target. Indeed, according to serum leptin level and metabolic disturbances, a recombinant analog of leptin can be used (Paz-Filho, Mastronardi, et Licinio 2015).

B. Clinical and biological observations

Several articles, have tried to highlight biological and clinical pattern in FPLD2 typical form. Moreover, difference between affected men and women has been investigated. A study including subjects from a Canadian FPLD2 kindreds compared to unaffected patients from the same families, have explored the clinical features. Males and females display lower HDL-cholesterol levels and higher LDL-cholesterol levels compared to control patients underscoring a higher prevalence of dyslipidemia. (68.6% FPLD2 patients vs 7.8% in unaffected patients). However, the study notices no differences in the prevalence of hypertension and glucose intolerance (H. Cao et Hegele 2000).

FPLD2 affected women presenting, compared to a cohort of women patients a significant increase of the prevalence of atherosclerotic cardiovascular disease (45% FPLD2 patients vs 15% in unaffected patients). Surprisingly, male FPLD2 patients reveals no differences with male controls (Hegele 2000). Nevertheless, FPLD2 patients have an increase of the prevalence of coronary heart disease according to age. 26.1% and 34.8% of FPLD2 patients presenting coronary heart disease respectively before 55 years old and after. Unaffected patients exhibit 5.1% after 55 years old and none before (A. Garg 2000).

Patients with lipodystrophy and *LMNA* mutations appear to be with higher risk of atherosclerotic cardiovascular cause by metabolic disturbances such as insulinoreistance and dyslipidemia (Hussain, Patni, et Garg 2019).

C. Differential diagnosis

During the last two decades, the emergence of genetical diagnosis highlights numerous mutations in different genes associated with lipodystrophic syndromes. It revealed two clinical categories defined by the severity of lipoatrophy: congenital generalized lipodystrophy (CGL) characterized by total loss of subcutaneous adipose tissue and familial partial lipodystrophy (FPLD) leading to a partial loss and hypertrophic region of adipose tissue (Hussain et Garg 2016).

Congenital generalized lipodystrophies exhibit complete loss of subcutaneous tissue leading to metabolic disorders early in life such as extreme insulin resistance, hypertriglyceridemia, increased basal metabolism, acanthosis nigricans and pancreatitis. The prevalence remains rare, around 1 over 10 million. Nowadays, 4 genes have been associated to 4 similar clinical phenotypes but recognizable (*BSCL2*, *AGPAT2*, *CAV1* and *PTRF*) (Chen et al. 2009; C. A. Kim et al. 2008; Rostami et al. 2013). These genes are involved in lipid droplets formation, biochemical pathway leading to triglycerides formation and caveolae internalization and triglycerides storage. Clinicals and biological hallmarks attest the adipocytes inability to storage

and release the energy contained in triglycerides. Metabolic imbalance is straightly to the adipose tissue in capacity of endocrine secretion (M.-C. Vantyghem et al. 2012):

Familial partial lipodystrophies are associated with mutations in 6 different genes. *LMNA* mutations caused the more frequent FPLD known as Dunnigan syndrome. The other described forms are less frequent. Surprisingly, FPLD1 or Kobberling syndrome remains today without identification of a monogenic inheritance pattern. Patients display childhood onset, central obesity and lower limb lipoatrophy characterized by the same metabolic disorders noted in Dunnigan syndrome (Jackson et al. 1997).

Type 3 familial partial lipodystrophy is the second genetic cause of partial lipodystrophies. It caused by heterozygous mutations of $PPAR\gamma$ characterizing autosomal dominant inheritance. Patients display a phenotype less severe than FPLD2, comparable to metabolic syndrome pattern. Android appearance is associated to lower limbs lipoatrophy and metabolic disorders including high blood pressure, severe hypertriglyceridemia and an increased serum levels of creatine phosphokinase (Astapova et Leff 2014; Campeau et al. 2012). $PPAR\gamma$ is a transcription factor involved in numerous cell mechanisms, highly expressed in adipocytes. $PPAR\gamma$ has a key role in adipocyte differentiation and provide the development of preadipocytes to mature adipocytes (Otto et Lane 2005).

FPLD4 is caused by *PLIN1* homozygous and compound heterozygous mutations. Patients develop diabetes mellitus, high blood pressure and lower limbs lipoatrophy underscoring a cushingoid syndrome; often associated with muscular pseudohypertrophy and cardiac anomalies (Kozusko et al. 2015).

Less frequently, FPLD5 and FPLD6, are due respectively to *CIDEA* and *LIPE* homozygous mutations. *CIDEA* and *LIPE* mutations are rare and have been associated respectively in 7 patients combined (*CIDEA*: 1 patient; *LIPE*: 6 patients). *CIDEA* is implied in the lipid droplets

formation and colocalize with perilipin. In childhood, adipocytes contain several lipid droplets leading to storage deficit and liberation of free fatty acids. Patients exhibit lower limbs lipodystrophy associated with metabolic disorders: diabetes mellitus, hypertriglyceridemia and increased blood pressure (Rubio-Cabezas et al. 2009). LIPE encodes for hormone-sensitive lipase, highly expressed in adipose tissue, involved in glycerides and cholesterol hydrolysis in adulthood. Enzymatic deficit leads to lower limbs lipodystrophy, myopathy and metabolic disorders such as diabetes mellitus, hypertriglyceridemia and hepatic steatosis (Farhan et al. 2014).

Finally, familial lipodystrophy has been described in one family carrying AKT2 mutations. Clinical examination revealed 35% decreased fat mass and a similar appearance as Dunnigan syndrome associated to severe insulin resistance (George et al. 2004).

IV. Atypical familial partial lipodystrophy

One of the most interesting aspects of laminopathies lie in the phenotype-genotype correlation leading to clinical heterogeneity. *LMNA* mutations as previously described can induce various forms from tissue-specific laminopathies up to severe multisystemic laminopathies. *LMNA* mutations associated to adipose tissue specific laminopathies reveal under subtle forms, noticeable differences allowing distinction of different clinical phenotype.

Clinical forms can be separated in four different entities. The “pure” form known as Dunnigan syndrome or FPLD2 was described previously, is caused by mutational hot-spot located in exon 8, codon 482. Other *LMNA* mutations have been associated with phenotypes affecting adipose tissue and leading to metabolic disturbances which include Metabolic Syndrome, Insulin resistance syndrome and forms harder to define and can be encompassed generally under the name “metabolic laminopathies”. We will describe each specifications of the different phenotypes from the less severe to the atypical form of lipodystrophies.

A retrospective study comparing FPLD2 patients and atypical FPLD forms due to non 482 *LMNA* mutations revealed noticeable differences. Indeed, non 482 FPLD have significantly higher levels of glucose intolerance and hypertriglyceridemia. The non 482 FPLD patients have higher percentage of cardiovascular disease such as arhythmias or coronary disease leading to an increased rate of sudden death.

A. Insulin resistance syndrome

Only a couple *LMNA* mutations have been associated to insulin resistance syndrome (Young et al. 2005; Le Dour et al. 2017). Clinically, patients don't exhibit central obesity or abnormal distribution of adipose tissue. Predominantly, they present severe insulin resistance evolving in diabetes mellitus. They don't display other metabolic disturbances. A recent study including

60,706 unrelated individuals has highlighted an association between *LMNA* mutation p.Gly602Ser and insulin resistance in African American population (Florwick et al. 2017). An article reports the case of a woman native from Reunion Island carrying the same mutation. She presents insulin resistance, PCOS and exhibits nuclear alterations of fibroblasts. The mutation cosegregates in two generations, in two male members displaying insulin resistance (Young et al. 2005).

B. Metabolic syndrome

Metabolic syndrome became during the last two decades a major issue in public health in the world. The prevalence is estimated around 20-25% in the world (Kwapich et al. 2018). Metabolic syndrome is defined by the association of central obesity, dyslipidemia and insulin resistance (Alberti, Zimmet, et Shaw 2006). In recent years, few papers described *LMNA* mutations associated with patients presenting a metabolic syndrome. Numerous studies report patients presenting metabolic syndrome with specific traits that can be related to genetic lipodystrophies. These patients can present hypertrophy of adipose tissue on the trunk and the neck but contrarily to FPLD2, they don't display lower limbs lipoatrophy and exhibit high serum levels of leptin (Decaudain et al. 2007). They exhibit metabolic disturbances with early onset compared to classical cases of metabolic syndrome worsening cardiovascular complications. Mutations can be found alongside *LMNA* gene. They also display 15 to 25% of nuclear abnormalities compared to 5% in control cells in fibroblasts (Dutour et al. 2011). In 2011, Dutour described in a cohort of 87 patients with metabolic syndrome, 3 patients with a single mutation in *LMNA* or *ZMPSTE24* gene and a rate of nuclear abnormalities superior to 30% (Dutour et al. 2011). Interestingly, patient with *ZMPSTE24* mutation harbors prelamina A mutation which disturbs the structure of *ZMPSTE24* leading to uncomplete processing of

prelamin A (Quigley et al. 2013). Furthermore, at cellular level, fibroblasts show accelerated senescence underscoring indirectly the role of lamin A (Galant et al. 2016).

C. Metabolic laminopathies

Metabolic laminopathies are characterized by abnormal localization of adipose tissue with metabolic disturbances combined with myopathy, neuropathy and signs of premature aging. Mostly, milder form of overlapping syndrome encompasses lipodystrophy and cardiomyopathy. Even if myopathy is not unusual, it can vary between muscular hypertrophy and muscular weakness. The forms of atypical laminopathies can be very elusive and vary according to the position of mutations and other factors susceptible to generate variable expressivity or incomplete penetrance (Corinne Vigouroux et al. 2018). A study reports a Dutch family presenting an atypical form of FPLD2. Three cases carry *LMNA* p.Glu223Lys mutation. The index case displays abnormal fat localization characterized by hypertrophy of adipose tissue in the neck (buffalo hump) and central obesity. He suffered from hypertriglyceridemia, diabetes mellitus, hepatic steatosis. He died of cardiovascular disease at 47 years old. He presented low adiponectin and leptin levels. His two sons, carrying the same mutation, present the same metabolic disturbances and central obesity. Surprisingly, the three cases also display dysmorphic facial features similar to those observed in multisystemic laminopathies such as progeroid syndrome. At cellular level, patients fibroblasts exhibit an increase rate of nuclear blebbing and abnormalities compared to control patients (Weterings et al. 2013). Another mutation (*LMNA*: p.Arg133Lys) was described in a patient with generalized lipodystrophy (BMI: 19.6) associated with pseudo muscular hypertrophy. Metabolic disturbances such as hypertriglyceridemia, diabetes mellitus appear with early onset, between 20 and 30 years old. Patients also suffer from left ventricular hypertrophy and exhibit at cellular level, 15% abnormal nuclear features and a decrease of lamin B1 staining (Caux et al. 2003).

Interestingly, a missense *LMNA* mutation p.Arg471Gly was associated with different phenotypes in a family and incomplete penetrance. Two sisters display partial lipodystrophy, diabetes mellitus, dysmorphic traits and acanthosis nigricans respectively at 14 and 18 years old. The father suffers from hypercholesterolemia and doesn't present signs of lipodystrophy or diabetes mellitus (Muschke et al. 2007). A different mutation in the same codon (*LMNA*: p.Arg471Cys) has been described with compound heterozygous mutation (*LMNA*: p.Arg527Cys) in a patient with progeria (Henian Cao et Hegele 2003).

Recently, a paper highlights a mutation (*LMNA*: p.Arg582Cys) in a family at heterozygous and homozygous state (Montenegro et al. 2018). 3 women carrying the mutation in homozygotic form display a severe atypical lipodystrophy with metabolic disturbances whereas a male member of the family harboring the heterozygous mutation, present a milder form of lipodystrophy similar to a female patient described few years before (Mory et al. 2012).

Furthermore, Jeru and coworkers observed an anticipation phenomenon on 3 generations of patients presenting a lipodystrophy caused by a *LMNA* mutation. This unique case notes the appearance of lipodystrophy and hypertriglyceridemia 15 days earlier in the third generation than the first generation at an average age of 18 years old underscoring the necessity of molecular diagnosis of relatives and early clinical follow-up (Jeru et al. 2017).

V. Adipose tissue alteration and *LMNA* mutations

The different clinical forms of lipodystrophies caused by *LMNA* mutations suggest common mechanisms to understand its physiopathology. Since the first description of Dunnigan syndrome, numerous leads have been followed in order to understand adipose tissue alteration.

The clinical heterogeneity of laminopathies have been studied at a cellular level to highlight mechanisms leading to such variability. Premature aging observed in progeroid syndrome due to prelamin accumulation suggest an effect on tissue specific laminopathies. The research established in adipose tissue laminopathies showed signs of premature senescence at cellular level (Dutour et al. 2011; Broers et al. 2006). Nuclear abnormalities, decreased replicative and proliferative capacity of cells mitochondrial alterations and ROS increase are characterized in different type of lipodystrophies related to *LMNA* mutations (Caron et al. 2007). In numerous cases, heterozygous missense mutations don't lead to prelamin A accumulation suggesting a different mechanism. Some papers explain fat defect by modifications of nuclear lamina structure. Positively charged amino acids (Arginin) modifications by neutral or negatively charged amino acids may induce the disruption of the tridimensional meshwork of lamins (Caux et al. 2003; Favreau et al. 2003). Furthermore, experiments showed alterations of post translational modifications such as sumoylation. Mutations located in the Ig fold domain disrupt sumoylation via SUMO-1 affecting the formation and the localization of lamins filaments (Simon et al. 2013). Other studies showed a decrease of p53 and p21, two key factors of cell cycle, in lipoma of lipodystrophic patients (Araújo-Vilar et al. 2012). p53 activation inhibits differentiation of adipose tissue precursors preventing PPAR γ action. p53 decrease leads to an impaired turnover of adipocyte inducing fat tissue accumulation (Molchadsky et al. 2008). pRb is involved in the regulation of the cell cycle controlling G1-S phase (Frolov et Dyson 2004). The decrease of pRb in lipoma of lipodystrophic patients support the alteration of adipose tissue turnover.

Adipose tissue is constantly submitted to environmental factors and precursors making difficult its understanding. Recent studies mTor protein proves to be a major crossroad involved in adipose tissue properties (Cai, Dong, et Liu 2016). mTor pathway dysregulation has been related to numerous pathologies of which diabetes, obesity, premature aging and autoimmune disorders (Khamzina et al. 2005). mTor forms complexes: mTorC1 and mTorC2. mTor complexes are needed in adipogenesis, lipid metabolism, adipokine synthesis, thermogenesis, insulin pathway and growth factors (Yoon et al. 2013). Mainly, mTorC1 is needed for adipose tissue homeostasis and activates energy uptake through lipid storage, lipogenesis and inhibiting lipolysis (Chakrabarti et al. 2010; Lamming et Sabatini 2013). At the opposite, mTorC2 is independent from energy uptake or expenditure and play a role in cell survival, proliferation and cytoskeleton organization remaining triggered by growth factors (Su et Jacinto 2011).

First, mTorC1 play a role in adipogenesis triggering AKT. AKT induces adipocyte differentiation, via signaling pathway, stimulating PPAR γ which is a key transcription factor in adipose tissue (Nakae et al. 2003). AKT and mTor are intertwined and regulate adipogenesis (Zhang et al. 2009). mTorC1 inhibition signaling with rapamycin disrupts adipogenesis (J. E. Kim et Chen 2004). Furthermore, mTorC1 activates directly PPAR γ inducing pre-adipocytes differentiation to mature adipocytes and can favored lipogenesis and adipocyte functions (Lefterova et al. 2014).

On the other hand, mTorC1 is involved in lipogenesis and lipid homeostasis (Porstmann et al. 2008) by a correlation with SREPB1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1), a main transcription factor implicated in the response of 30 genes regulating and triggering adipocyte functions (Shao et Espenshade 2012). In FPLD2 characterized by prelamina A accumulation recruiting BAF interfering with SREPB1 (Capanni et al. 2012). SREBP1 pool is sequestered and becomes inefficient to activate PPAR γ and adipogenesis (Capanni et al. 2005). In *LMNA*-

/- mice, lipolysis induces decrease of adipose tissue and mTor is aberrantly activated (K. Cao et al. 2011).

The studies highlight a link between lamin A and mTor via signaling pathway and regulatory elements. This connection correlates adipose tissue homeostasis through AKT, SREPB1 and PPAR γ and the balance of lamins responsible of the maintenance and the structure of the nucleus (Chiarini et al. 2019). Furthermore, mTor induces autophagy to eliminate toxic protein. Interestingly, mutated lamins are involved in inhibition of autophagy holding the mutated lamin pool (V. Cenni et al. 2011; Dou et al. 2015; Evangelisti, Cenni, et Lattanzi 2016).

The role of lamins mutations in adipose tissue remains unclear despite the numerous insights brought by the last studies. We can determine that *LMNA* mutations induce nuclear defects affecting lamina and nuclear structure. Consequently, homeostasis of adipose tissue is unbalanced by impaired adipocytes differentiation due to inefficient synthesis of adipocyte precursors. Hence, FPLD patients carrying *LMNA* mutations display various defects disrupting the development of adipose tissue that can related to lipodystrophic syndrome observed in patients. The recent studies highlight new therapeutic targets such as mTor inhibitors (rapamycin, rapalogs), autophagic activators and leptin replacement therapy (metrelepin). Rapamycin and Metreleptin are already used in vivo in animal models and in human therapeutics improving metabolic disturbances and abnormal fat distribution and cardiac functions.

VI. References

- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle, et L. Gerace. 1986. « The Nuclear Lamina Is a Meshwork of Intermediate-Type Filaments ». *Nature* 323 (6088): 560-64. <https://doi.org/10.1038/323560a0>.
- Agarwal, Anil K., Jean-Pierre Fryns, Richard J. Auchus, et Abhimanyu Garg. 2003. « Zinc Metalloproteinase, ZMPSTE24, Is Mutated in Mandibuloacral Dysplasia ». *Human Molecular Genetics* 12 (16): 1995-2001.
- Ahmed, Muhammad Saad, Sana Ikram, Nousheen Bibi, et Asif Mir. 2017. « Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease ». *Molecular Neurobiology*, juin. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0610-7>.
- Alberti, K. G. M. M., P. Zimmet, et J. Shaw. 2006. « Metabolic Syndrome--a New World-Wide Definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation ». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 23 (5): 469-80. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>.
- Araújo-Vilar, D., B. Victoria, B. González-Méndez, F. Barreiro, B. Fernández-Rodríguez, R. Cereijo, J. M. Gallego-Escuredo, F. Villarroya, et A. Pañeda-Menéndez. 2012. « Histological and Molecular Features of Lipomatous and Nonlipomatous Adipose Tissue in Familial Partial Lipodystrophy Caused by LMNA Mutations ». *Clinical Endocrinology* 76 (6): 816-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04208.x>.
- Astapova, Olga, et Todd Leff. 2014. « PPAR γ Mutations, Lipodystrophy and Diabetes ». *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 20 (2): 63-70. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0033>.
- Blackburn, Elizabeth H., Elissa S. Epel, et Jue Lin. 2015. « Human Telomere Biology: A Contributory and Interactive Factor in Aging, Disease Risks, and Protection ». *Science (New York, N.Y.)* 350 (6265): 1193-98. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>.
- Bonne, G., M. R. Di Barletta, S. Varnous, H. M. Bécane, E. H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, et al. 1999. « Mutations in the Gene Encoding Lamin A/C Cause Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 21 (3): 285-88. <https://doi.org/10.1038/6799>.
- Bonne, Gisèle, et Susana Quijano-Roy. 2013. « Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, Laminopathies, and Other Nuclear Envelopathies ». *Handbook of Clinical Neurology* 113: 1367-76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00007-1>.
- Bouhouche, A., A. Benomar, N. Birouk, A. Mularoni, F. Meggouh, J. Tassin, D. Grid, et al. 1999. « A Locus for an Axonal Form of Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Disease Maps to Chromosome 1q21.2-Q21.3 ». *American Journal of Human Genetics* 65 (3): 722-27. <https://doi.org/10.1086/302542>.
- Broers, J. L. V., F. C. S. Ramaekers, G. Bonne, R. Ben Yaou, et C. J. Hutchison. 2006. « Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing ». *Physiological Reviews* 86 (3): 967-1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2005>.
- Cabanillas, Rubén, Juan Cadiñanos, José A. F. Villameytide, Mercedes Pérez, Jesús Longo, José M. Richard, Rebeca Alvarez, et al. 2011. « Néstor-Guillermo Progeria Syndrome: A Novel Premature Aging Condition with Early Onset and Chronic Development Caused by BANF1 Mutations ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 155A (11): 2617-25. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34249>.
- Cai, Huan, Lily Q. Dong, et Feng Liu. 2016. « Recent Advances in Adipose MTOR Signaling and Function: Therapeutic Prospects ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (4): 303-17. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.11.011>.
- Campeau, Philippe M., Olga Astapova, Rebecca Martins, Jean Bergeron, Patrick Couture, Robert A. Hegele, Todd Leff, et Claude Gagné. 2012. « Clinical and Molecular Characterization of a Severe Form of Partial Lipodystrophy Expanding the Phenotype of PPAR γ Deficiency ». *Journal of Lipid Research* 53 (9): 1968-78. <https://doi.org/10.1194/jlr.P025437>.

- Cao, H., et R. A. Hegele. 2000. « Nuclear Lamin A/C R482Q Mutation in Canadian Kindreds with Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy ». *Human Molecular Genetics* 9 (1): 109-12.
- Cao, Henian, et Robert A. Hegele. 2003. « LMNA Is Mutated in Hutchinson-Gilford Progeria (MIM 176670) but Not in Wiedemann-Rautenstrauch Progeroid Syndrome (MIM 264090) ». *Journal of Human Genetics* 48 (5): 271-74. <https://doi.org/10.1007/s10038-003-0025-3>.
- Cao, Kan, John J. Graziotto, Cecilia D. Blair, Joseph R. Mazzulli, Michael R. Erdos, Dimitri Krainc, et Francis S. Collins. 2011. « Rapamycin Reverses Cellular Phenotypes and Enhances Mutant Protein Clearance in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells ». *Science Translational Medicine* 3 (89): 89ra58. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002346>.
- Capanni, Cristina, Elisabetta Mattioli, Marta Columbaro, Enrico Lucarelli, Veena K. Parnaik, Giuseppe Novelli, Manfred Wehnert, et al. 2005. « Altered Pre-Lamin A Processing Is a Common Mechanism Leading to Lipodystrophy ». *Human Molecular Genetics* 14 (11): 1489-1502. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi158>.
- Capanni, Cristina, Stefano Squarzone, Vittoria Cenni, Maria Rosaria D'Apice, Alessandra Gambineri, Giuseppe Novelli, Manfred Wehnert, Renato Pasquali, Nadir M. Maraldi, et Giovanna Lattanzi. 2012. « Familial Partial Lipodystrophy, Mandibuloacral Dysplasia and Restrictive Dermopathy Feature Barrier-to-Autointegration Factor (BAF) Nuclear Redistribution ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11 (19): 3568-77. <https://doi.org/10.4161/cc.21869>.
- Captur, Gabriella, Eloisa Arbustini, Gisèle Bonne, Petros Syrris, Kevin Mills, Karim Wahbi, Saidi A. Mohiddin, et al. 2017. « Lamin and the Heart ». *Heart (British Cardiac Society)*, novembre. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-312338>.
- Caron, M., M. Auclair, B. Donadille, V. Béréziat, B. Guerci, M. Laville, H. Narbonne, et al. 2007. « Human Lipodystrophies Linked to Mutations in A-Type Lamins and to HIV Protease Inhibitor Therapy Are Both Associated with Prelamin A Accumulation, Oxidative Stress and Premature Cellular Senescence ». *Cell Death and Differentiation* 14 (10): 1759-67. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402197>.
- Cau, Pierre, Claire Navarro, Karim Harhour, Patrice Roll, Sabine Sigaudy, Elise Kaspi, Sophie Perrin, Annachiara De Sandre-Giovannoli, et Nicolas Lévy. 2014. « Nuclear Matrix, Nuclear Envelope and Premature Aging Syndromes in a Translational Research Perspective ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29 (mai): 125-47. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.021>.
- Caux, F., E. Dubosclard, O. Lascols, B. Buendia, O. Chazouillères, A. Cohen, J.-C. Courvalin, et al. 2003. « A New Clinical Condition Linked to a Novel Mutation in Lamins A and C with Generalized Lipoatrophy, Insulin-Resistant Diabetes, Disseminated Leukomelanodermic Papules, Liver Steatosis, and Cardiomyopathy ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (3): 1006-13. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021506>.
- Cenni, V., C. Capanni, M. Columbaro, M. Ortolani, M. R. D'Apice, G. Novelli, M. Fini, et al. 2011. « Autophagic Degradation of Farnesylated Prelamin A as a Therapeutic Approach to Lamin-Linked Progeria ». *European Journal of Histochemistry: EJH* 55 (4): e36. <https://doi.org/10.4081/ejh.2011.e36>.
- Cenni, Vittoria, Maria Rosaria D'Apice, Paolo Garagnani, Marta Columbaro, Giuseppe Novelli, Claudio Franceschi, et Giovanna Lattanzi. 2018. « Mandibuloacral Dysplasia: A Premature Ageing Disease with Aspects of Physiological Ageing ». *Ageing Research Reviews* 42 (mars): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.001>.
- Chakrabarti, Partha, Taylor English, Jun Shi, Cynthia M. Smas, et Konstantin V. Kandror. 2010. « Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Suppresses Lipolysis, Stimulates Lipogenesis, and Promotes Fat Storage ». *Diabetes* 59 (4): 775-81. <https://doi.org/10.2337/db09-1602>.
- Chen, Weiqin, Vijay K. Yechoor, Benny Hung-Junn Chang, Ming V. Li, Keith L. March, et Lawrence Chan. 2009. « The Human Lipodystrophy Gene Product Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy 2/Seipin Plays a Key Role in Adipocyte Differentiation ». *Endocrinology* 150 (10): 4552-61. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0236>.
- Chiarini, Francesca, Camilla Evangelisti, Vittoria Cenni, Antonietta Fazio, Francesca Paganelli, Alberto M. Martelli, et Giovanna Lattanzi. 2019. « The Cutting Edge: The Role of MTOR Signaling in

- Laminopathies ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4).
<https://doi.org/10.3390/ijms20040847>.
- Choi, Jason C., et Howard J. Worman. 2014. « Nuclear Envelope Regulation of Signaling Cascades ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 773: 187-206. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_9.
- Cunningham, Vicki J., Maria Rosaria D'Apice, Norma Licata, Giuseppe Novelli, et Tim Cundy. 2010. « Skeletal Phenotype of Mandibuloacral Dysplasia Associated with Mutations in ZMPSTE24 ». *Bone* 47 (3): 591-97. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.06.004>.
- D'Amico, A., G. Haliloglu, P. Richard, B. Talim, S. Maugenre, A. Ferreira, P. Guicheney, et al. 2005. « Two Patients with "Dropped Head Syndrome" Due to Mutations in LMNA or SEPN1 Genes ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 15 (8): 521-24.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.03.006>.
- De Sandre-Giovannoli, Annachiara, Rafaëlle Bernard, Pierre Cau, Claire Navarro, Jeanne Amiel, Irène Boccaccio, Stanislas Lyonnet, et al. 2003. « Lamin a Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5628): 2055.
<https://doi.org/10.1126/science.1084125>.
- De Sandre-Giovannoli, Annachiara, Malika Chaouch, Serguei Kozlov, Jean-Michel Vallat, Meriem Tazir, Nadia Kassouri, Pierre Szepetowski, et al. 2002. « Homozygous Defects in LMNA, Encoding Lamin A/C Nuclear-Envelope Proteins, Cause Autosomal Recessive Axonal Neuropathy in Human (Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2) and Mouse ». *American Journal of Human Genetics* 70 (3): 726-36. <https://doi.org/10.1086/339274>.
- De Vos, Winnok H., Frederik Houben, Ron A. Hoebe, Raoul Hennekam, Baziel van Engelen, Erik M. M. Manders, Frans C. S. Ramaekers, Jos L. V. Broers, et Patrick Van Oostveldt. 2010. « Increased Plasticity of the Nuclear Envelope and Hypermobility of Telomeres Due to the Loss of A-Type Lamins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (4): 448-58.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.002>.
- Decaudain, Aurélie, Marie-Christine Vantyghem, Bruno Guerci, Annie-Claude Hécart, Martine Auclair, Yves Reznik, Hervé Narbonne, et al. 2007. « New Metabolic Phenotypes in Laminopathies: LMNA Mutations in Patients with Severe Metabolic Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (12): 4835-44. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0654>.
- Dechat, Thomas, Stephen A. Adam, Pekka Taimen, Takeshi Shimi, et Robert D. Goldman. 2010. « Nuclear Lamins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a000547.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000547>.
- Dhe-Paganon, Sirano, Eric D. Werner, Young-In Chi, et Steven E. Shoelson. 2002. « Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 17381-84.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200038200>.
- Dittmer, Travis A., et Tom Misteli. 2011. « The Lamin Protein Family ». *Genome Biology* 12 (5): 222.
<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>.
- Dou, Zhixun, Caiyue Xu, Greg Donahue, Takeshi Shimi, Ji-An Pan, Jiajun Zhu, Andrejs Ivanov, et al. 2015. « Autophagy Mediates Degradation of Nuclear Lamina ». *Nature* 527 (7576): 105-9.
<https://doi.org/10.1038/nature15548>.
- Doubaj, Yassamine, Annachiara De Sandre-Giovannoli, Esteves-Vieira Vera, Claire Laure Navarro, Siham Chafai Elalaoui, Mariam Tajir, Nicolas Lévy, et Abdelaziz Sefiani. 2012. « An Inherited LMNA Gene Mutation in Atypical Progeria Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 158A (11): 2881-87. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35557>.
- Dunnigan, M. G., M. A. Cochrane, A. Kelly, et J. W. Scott. 1974. « Familial Lipoatrophic Diabetes with Dominant Transmission. A New Syndrome ». *The Quarterly Journal of Medicine* 43 (169): 33-48.
- Dutour, Anne, Patrice Roll, Bénédicte Gaborit, Sébastien Courier, Marie-Christine Alessi, David-Alexandre Tregouet, Fabien Angelis, et al. 2011. « High Prevalence of Laminopathies among Patients with Metabolic Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 20 (19): 3779-86.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr294>.

- Elkhatib, Razan, Guy Longepied, Marine Paci, Vincent Achard, Jean-Marie Grillo, Nicolas Levy, Michael J. Mitchell, et Catherine Metzler-Guillemain. 2015. « Nuclear Envelope Remodelling during Human Spermiogenesis Involves Somatic B-Type Lamins and a Spermatid-Specific B3 Lamin Isoform ». *Molecular Human Reproduction* 21 (3): 225-36. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau111>.
- Eriksson, Maria, W. Ted Brown, Leslie B. Gordon, Michael W. Glynn, Joel Singer, Laura Scott, Michael R. Erdos, et al. 2003. « Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome ». *Nature* 423 (6937): 293-98. <https://doi.org/10.1038/nature01629>.
- Evangelisti, Camilla, Vittoria Cenni, et Giovanna Lattanzi. 2016. « Potential Therapeutic Effects of the MTOR Inhibitors for Preventing Ageing and Progeria-Related Disorders ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 82 (5): 1229-44. <https://doi.org/10.1111/bcp.12928>.
- Farhan, Sali M. K., John F. Robinson, Adam D. McIntyre, Maria G. Marrosu, Anna F. Ticca, Sara Loddo, Nicola Carboni, Francesco Brancati, et Robert A. Hegele. 2014. « A Novel LIPE Nonsense Mutation Found Using Exome Sequencing in Siblings with Late-Onset Familial Partial Lipodystrophy ». *The Canadian Journal of Cardiology* 30 (12): 1649-54. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.09.007>.
- Fatkin, D., C. MacRae, T. Sasaki, M. R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, et al. 1999. « Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin A/C Gene as Causes of Dilated Cardiomyopathy and Conduction-System Disease ». *The New England Journal of Medicine* 341 (23): 1715-24. <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412302>.
- Favreau, Catherine, Emmanuelle Dubosclard, Cecilia Ostlund, Corinne Vigouroux, Jacqueline Capeau, Manfred Wehnert, Dominique Higuette, Howard J. Worman, Jean-Claude Courvalin, et Brigitte Buendia. 2003. « Expression of Lamin A Mutated in the Carboxyl-Terminal Tail Generates an Aberrant Nuclear Phenotype Similar to That Observed in Cells from Patients with Dunnigan-Type Partial Lipodystrophy and Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Experimental Cell Research* 282 (1): 14-23.
- Florwick, Alyssa, Tejas Dharmaraj, Julie Jurgens, David Valle, et Katherine L. Wilson. 2017. « LMNA Sequences of 60,706 Unrelated Individuals Reveal 132 Novel Missense Variants in A-Type Lamins and Suggest a Link between Variant p.G602S and Type 2 Diabetes ». *Frontiers in Genetics* 8: 79. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00079>.
- Frolov, Maxim V., et Nicholas J. Dyson. 2004. « Molecular Mechanisms of E2F-Dependent Activation and PRB-Mediated Repression ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 11): 2173-81. <https://doi.org/10.1242/jcs.01227>.
- Galant, Damien, Bénédicte Gaborit, Camille Desgrouas, Ines Abdesselam, Monique Bernard, Nicolas Levy, Françoise Merono, et al. 2016. « A Heterozygous ZMPSTE24 Mutation Associated with Severe Metabolic Syndrome, Ectopic Fat Accumulation, and Dilated Cardiomyopathy ». *Cells* 5 (2). <https://doi.org/10.3390/cells5020021>.
- Garg, A. 2000. « Gender Differences in the Prevalence of Metabolic Complications in Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety) ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (5): 1776-82. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.5.6605>.
- Garg, Abhimanyu. 2004. « Acquired and Inherited Lipodystrophies ». *The New England Journal of Medicine* 350 (12): 1220-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMra025261>.
- George, Stella, Justin J. Rochford, Christian Wolfrum, Sarah L. Gray, Sven Schinner, Jenny C. Wilson, Maria A. Soos, et al. 2004. « A Family with Severe Insulin Resistance and Diabetes Due to a Mutation in AKT2 ». *Science (New York, N.Y.)* 304 (5675): 1325-28. <https://doi.org/10.1126/science.1096706>.
- Gilford, H. 1897. « On a Condition of Mixed Premature and Immature Development ». *Medico-Chirurgical Transactions* 80: 17-46.25.
- Gonzalez-Suarez, Ignacio, Abena B. Redwood, Stephanie M. Perkins, Bart Vermolen, Daniel Lichtensztejn, David A. Grotzky, Lucia Morgado-Palacin, et al. 2009. « Novel Roles for A-Type

- Lamins in Telomere Biology and the DNA Damage Response Pathway ». *The EMBO Journal* 28 (16): 2414-27. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.196>.
- Gonzalo, Susana, et Joel C. Eissenberg. 2016. « Tying up Loose Ends: Telomeres, Genomic Instability and Lamins ». *Current Opinion in Genetics & Development* 37 (avril): 109-18. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.003>.
- Gordon, Leslie B., Frank G. Rothman, Carlos López-Otín, et Tom Misteli. 2014. « Progeria: A Paradigm for Translational Medicine ». *Cell* 156 (3): 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.028>.
- Guelen, Lars, Ludo Pagie, Emilie Brassat, Wouter Meuleman, Marius B. Faza, Wendy Talhout, Bert H. Eussen, et al. 2008. « Domain Organization of Human Chromosomes Revealed by Mapping of Nuclear Lamina Interactions ». *Nature* 453 (7197): 948-51. <https://doi.org/10.1038/nature06947>.
- Guillín-Amarelle, Cristina, Antía Fernández-Pombo, Sofía Sánchez-Iglesias, et David Araújo-Vilar. 2018. « Lipodystrophic Laminopathies: Diagnostic Clues ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 9 (1): 249-60. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1454167>.
- Haas, Jan, Karen S. Frese, Barbara Peil, Wanda Kloos, Andreas Keller, Rouven Nietsch, Zhu Feng, et al. 2015. « Atlas of the Clinical Genetics of Human Dilated Cardiomyopathy ». *European Heart Journal* 36 (18): 1123-35. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu301>.
- Heald, R., et F. McKeon. 1990. « Mutations of Phosphorylation Sites in Lamin A That Prevent Nuclear Lamina Disassembly in Mitosis ». *Cell* 61 (4): 579-89.
- Hegele, R. A. 2000. « Familial Partial Lipodystrophy: A Monogenic Form of the Insulin Resistance Syndrome ». *Molecular Genetics and Metabolism* 71 (4): 539-44. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3092>.
- Horn, Henning F. 2014. « LINC Complex Proteins in Development and Disease ». *Current Topics in Developmental Biology* 109: 287-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00004-4>.
- Hussain, Iram, et Abhimanyu Garg. 2016. « Lipodystrophy Syndromes ». *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 45 (4): 783-97. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.012>.
- Hussain, Iram, Nivedita Patni, et Abhimanyu Garg. 2019. « Lipodystrophies, Dyslipidaemias and Atherosclerotic Cardiovascular Disease ». *Pathology* 51 (2): 202-12. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.004>.
- Hutchinson, J. 1886. « Illustrations of Exceptional Symptoms and Examples of Rare Forms of Disease ». *British Medical Journal* 1 (1330): 1211-12.
- Jackson, S. N., T. A. Howlett, P. G. McNally, S. O'Rahilly, et R. C. Trembath. 1997. « Dunnigan-Kobberling Syndrome: An Autosomal Dominant Form of Partial Lipodystrophy ». *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* 90 (1): 27-36.
- Jerath, Nivedita U., et Michael E. Shy. 2015. « Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: Understanding Molecular Pathogenesis Could Lead to Future Treatment Strategies ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1852 (4): 667-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.031>.
- Jeru, Isabelle, Camille Vatie, Marie-Christine Vantyghem, Olivier Lascols, et Corinne Vigouroux. 2017. « LMNA-Associated Partial Lipodystrophy: Anticipation of Metabolic Complications ». *Journal of Medical Genetics* 54 (6): 413-16. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104437>.
- Kakarougkas, A., et P. A. Jeggo. 2014. « DNA DSB Repair Pathway Choice: An Orchestrated Handover Mechanism ». *The British Journal of Radiology* 87 (1035): 20130685. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130685>.
- Khamzina, Leila, Alain Veilleux, Sébastien Bergeron, et André Marette. 2005. « Increased Activation of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway in Liver and Skeletal Muscle of Obese Rats: Possible Involvement in Obesity-Linked Insulin Resistance ». *Endocrinology* 146 (3): 1473-81. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0921>.
- Kim, C. A., Marc Delépine, Emilie Boutet, Haquima El Mourabit, Soazig Le Lay, Muriel Meier, Mona Nemani, et al. 2008. « Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with

- Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (4): 1129-34. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1328>.
- Kim, Jae Eun, et Jie Chen. 2004. « Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Activity by Mammalian Target of Rapamycin and Amino Acids in Adipogenesis ». *Diabetes* 53 (11): 2748-56.
- Kozusko, K., Vhm Tsang, W. Bottomley, Y. H. Cho, S. Gandotra, M. L. Mimmack, K. Lim, et al. 2015. « Clinical and Molecular Characterization of a Novel PLIN1 Frameshift Mutation Identified in Patients with Familial Partial Lipodystrophy ». *Diabetes* 64 (1): 299-310. <https://doi.org/10.2337/db14-0104>.
- Krimm, Isabelle, Cecilia Ostlund, Bernard Gilquin, Joël Couprie, Paul Hossenlopp, Jean-Paul Mornon, Gisèle Bonne, Jean-Claude Courvalin, Howard J. Worman, et Sophie Zinn-Justin. 2002. « The Ig-like Structure of the C-Terminal Domain of Lamin A/C, Mutated in Muscular Dystrophies, Cardiomyopathy, and Partial Lipodystrophy ». *Structure (London, England: 1993)* 10 (6): 811-23.
- Kwapich, M., D. Lacroix, S. Espiard, S. Ninni, F. Brigadeau, C. Kouakam, P. Degroote, et al. 2018. « Cardiometabolic Assessment of Lamin A/C Gene Mutation Carriers: A Phenotype-Genotype Correlation ». *Diabetes & Metabolism*, octobre. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.09.006>.
- Lamming, Dudley W., et David M. Sabatini. 2013. « A Central Role for MTOR in Lipid Homeostasis ». *Cell Metabolism* 18 (4): 465-69. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.002>.
- Le Dour, Caroline, Wei Wu, Véronique Béréziat, Jacqueline Capeau, Corinne Vigouroux, et Howard J. Worman. 2017. « Extracellular Matrix Remodeling and Transforming Growth Factor- β Signaling Abnormalities Induced by Lamin A/C Variants That Cause Lipodystrophy ». *Journal of Lipid Research* 58 (1): 151-63. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071381>.
- Lefterova, Martina I., Anders K. Haakonsson, Mitchell A. Lazar, et Susanne Mandrup. 2014. « PPAR γ and the Global Map of Adipogenesis and Beyond ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 25 (6): 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.04.001>.
- Li, Guohong, et Ping Zhu. 2015. « Structure and Organization of Chromatin Fiber in the Nucleus ». *FEBS Letters* 589 (20 Pt A): 2893-2904. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.023>.
- López-Otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, et Guido Kroemer. 2013. « The Hallmarks of Aging ». *Cell* 153 (6): 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Lüdtke, Angelika, Janine Genschel, Georg Brabant, Jürgen Bauditz, Matthias Taupitz, Martin Koch, Wolfram Wermke, Howard J. Worman, et Hartmut H.-J. Schmidt. 2005. « Hepatic Steatosis in Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy ». *The American Journal of Gastroenterology* 100 (10): 2218-24. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00234.x>.
- Machowska, Magdalena, Katarzyna Piekarczyk, et Ryszard Rzepecki. 2015. « Regulation of Lamin Properties and Functions: Does Phosphorylation Do It All? ». *Open Biology* 5 (11). <https://doi.org/10.1098/rsob.150094>.
- Manju, Kaliyaperumal, Bhattiprolu Muralikrishna, et Veena K. Parnaik. 2006. « Expression of Disease-Causing Lamin A Mutants Impairs the Formation of DNA Repair Foci ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 13): 2704-14. <https://doi.org/10.1242/jcs.03009>.
- McClintock, Dayle, Desiree Ratner, Meepa Lokuge, David M. Owens, Leslie B. Gordon, Francis S. Collins, et Karima Djabali. 2007. « The Mutant Form of Lamin A That Causes Hutchinson-Gilford Progeria Is a Biomarker of Cellular Aging in Human Skin ». *PloS One* 2 (12): e1269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001269>.
- Mercuri, Eugenio, Maja Poppe, Ros Quinlivan, Sonia Messina, Maria Kinali, Laurence Demay, John Bourke, et al. 2004. « Extreme Variability of Phenotype in Patients with an Identical Missense Mutation in the Lamin A/C Gene: From Congenital Onset with Severe Phenotype to Milder Classic Emery-Dreifuss Variant ». *Archives of Neurology* 61 (5): 690-94. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.690>.
- Molchadsky, Alina, Igor Shats, Naomi Goldfinger, Meirav Pevsner-Fischer, Melissa Olson, Ariel Rinon, Eldad Tzahor, et al. 2008. « P53 Plays a Role in Mesenchymal Differentiation Programs, in a

- Cell Fate Dependent Manner ». *PLoS One* 3 (11): e3707.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003707>.
- Montenegro, Renan Magalhães, Aline Dantas Costa-Riquetto, Virgínia Oliveira Fernandes, Ana Paula Dias Rangel Montenegro, Lucas Santos de Santana, Alexander Augusto de Lima Jorge, Lia Beatriz de Azevedo Souza Karbage, et al. 2018. « Homozygous and Heterozygous Nuclear Lamin A p.R582C Mutation: Different Lipodystrophic Phenotypes in the Same Kindred ». *Frontiers in Endocrinology* 9: 458. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00458>.
- Mory, Patricia B., Felipe Crispim, Maria Beatriz S. Freire, João Eduardo N. Salles, Cynthia M. Valério, Amelio F. Godoy-Matos, Sérgio A. Dib, et Regina S. Moisés. 2012. « Phenotypic Diversity in Patients with Lipodystrophy Associated with LMNA Mutations ». *European Journal of Endocrinology* 167 (3): 423-31. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0268>.
- Muchir, Antoine, et Howard J. Worman. 2010. « Signaling Defects and the Nuclear Envelope in Progeria ». *Developmental Cell* 19 (3): 355-56. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.019>.
- Muschke, Petra, Uwe Kölsch, Sibylle Jakubiczka, Ilse Wieland, Thomas Brune, et Peter Wieacker. 2007. « The Heterozygous LMNA Mutation p.R471G Causes a Variable Phenotype with Features of Two Types of Familial Partial Lipodystrophy ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 143A (23): 2810-14. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32046>.
- Nakae, Jun, Tadahiro Kitamura, Yukari Kitamura, William H. Biggs, Karen C. Arden, et Domenico Accili. 2003. « The Forkhead Transcription Factor Foxo1 Regulates Adipocyte Differentiation ». *Developmental Cell* 4 (1): 119-29.
- Navarro, Claire L., Pierre Cau, et Nicolas Lévy. 2006. « Molecular Bases of Progeroid Syndromes ». *Human Molecular Genetics* 15 Spec No 2 (octobre): R151-161.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddl214>.
- Navarro, Claire L., Annachiara De Sandre-Giovannoli, Rafaëlle Bernard, Irène Boccaccio, Amandine Boyer, David Geneviève, Smail Hadj-Rabia, et al. 2004. « Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) Defects Cause Nuclear Disorganization and Identify Restrictive Dermopathy as a Lethal Neonatal Laminopathy ». *Human Molecular Genetics* 13 (20): 2493-2503.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh265>.
- Otto, Tamara C., et M. Daniel Lane. 2005. « Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40 (4): 229-42.
<https://doi.org/10.1080/10409230591008189>.
- Paz-Filho, Gilberto, Claudio A. Mastronardi, et Julio Licinio. 2015. « Leptin Treatment: Facts and Expectations ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 64 (1): 146-56.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.07.014>.
- Porstmann, Thomas, Claudio R. Santos, Beatrice Griffiths, Megan Cully, Mary Wu, Sally Leivers, John R. Griffiths, Yuen-Li Chung, et Almut Schulze. 2008. « SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-Dependent Cell Growth ». *Cell Metabolism* 8 (3): 224-36.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>.
- Puckelwartz, Megan, et Elizabeth M. McNally. 2011. « Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Handbook of Clinical Neurology* 101: 155-66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00012-8>.
- Quigley, Andrew, Yin Yao Dong, Ashley C. W. Pike, Liang Dong, Leela Shrestha, Georgina Berridge, Phillip J. Stansfeld, et al. 2013. « The Structural Basis of ZMPSTE24-Dependent Laminopathies ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6127): 1604-7.
<https://doi.org/10.1126/science.1231513>.
- Quijano-Roy, Susana, Blaise Mbieleu, Carsten G. Bönnemann, Pierre-Yves Jeannot, Jaume Colomer, Nigel F. Clarke, Jean-Marie Cuisset, et al. 2008. « De Novo LMNA Mutations Cause a New Form of Congenital Muscular Dystrophy ». *Annals of Neurology* 64 (2): 177-86.
<https://doi.org/10.1002/ana.21417>.
- Raz, Vered, Bart J. Vermolen, Yuval Garini, Jos J. M. Onderwater, Mieke A. Mommaas-Kienhuis, Abraham J. Koster, Ian T. Young, Hans Tanke, et Roeland W. Dirks. 2008. « The Nuclear Lamina Promotes Telomere Aggregation and Centromere Peripheral Localization during

- Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 24): 4018-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.034876>.
- Redwood, Abena B., Stephanie M. Perkins, Robert P. Vanderwaal, Zhihui Feng, Kenneth J. Biehl, Ignacio Gonzalez-Suarez, Lucia Morgado-Palacin, et al. 2011. « A Dual Role for A-Type Lamins in DNA Double-Strand Break Repair ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (15): 2549-60. <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16531>.
- Rostami, Parastoo, Maryam Nakhaeimoghadam, Faezeh-Moghimpour Bijani, Arya Sotoudeh, Ali Rabbani, Pascale Hilbert, et Nima Rezaei. 2013. « AGPAT2 Gene Mutation in a Child with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy Syndrome ». *Annales D'endocrinologie* 74 (1): 59-61. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2012.11.008>.
- Rubio-Cabezas, Oscar, Vishwajeet Puri, Incoronata Murano, Vladimir Saudek, Robert K. Semple, Satya Dash, Caroline S. S. Hyden, et al. 2009. « Partial Lipodystrophy and Insulin Resistant Diabetes in a Patient with a Homozygous Nonsense Mutation in CIDEC ». *EMBO Molecular Medicine* 1 (5): 280-87. <https://doi.org/10.1002/emmm.200900037>.
- Scaffidi, Paola, et Tom Misteli. 2006. « Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5776): 1059-63. <https://doi.org/10.1126/science.1127168>.
- Schreiber, Katherine H., et Brian K. Kennedy. 2013. « When Lamins Go Bad: Nuclear Structure and Disease ». *Cell* 152 (6): 1365-75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.015>.
- Schuldt, Alison. 2013. « Mechanotransduction: Lamin A for Tension Relief ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (10): 610. <https://doi.org/10.1038/nrm3670>.
- Shao, Wei, et Peter J. Espenshade. 2012. « Expanding Roles for SREBP in Metabolism ». *Cell Metabolism* 16 (4): 414-19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.002>.
- Shibata, Atsushi, Sandro Conrad, Julie Birraux, Verena Geuting, Olivia Barton, Amani Ismail, Andreas Kakarougkas, et al. 2011. « Factors Determining DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice in G2 Phase ». *The EMBO Journal* 30 (6): 1079-92. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.27>.
- Shimi, Takeshi, Katrin Pflieger, Shin-ichiro Kojima, Chan-Gi Pack, Irina Solovej, Anne E. Goldman, Stephen A. Adam, et al. 2008. « The A- and B-Type Nuclear Lamin Networks: Microdomains Involved in Chromatin Organization and Transcription ». *Genes & Development* 22 (24): 3409-21. <https://doi.org/10.1101/gad.1735208>.
- Simon, Dan N., Tera Domaradzki, Wilma A. Hofmann, et Katherine L. Wilson. 2013. « Lamin A Tail Modification by SUMO1 Is Disrupted by Familial Partial Lipodystrophy-Causing Mutations ». *Molecular Biology of the Cell* 24 (3): 342-50. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-07-0527>.
- Solovej, Irina, Audrey S. Wang, Katharina Thanisch, Christine S. Schmidt, Stefan Krebs, Monika Zwerger, Tatiana V. Cohen, et al. 2013. « LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation ». *Cell* 152 (3): 584-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.009>.
- Sosa, Brian A., Andrea Rothbaler, Ulrike Kutay, et Thomas U. Schwartz. 2012. « LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins ». *Cell* 149 (5): 1035-47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.046>.
- Speckman, R. A., A. Garg, F. Du, L. Bennett, R. Veile, E. Arioglu, S. I. Taylor, M. Lovett, et A. M. Bowcock. 2000. « Mutational and Haplotype Analyses of Families with Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety) Reveal Recurrent Missense Mutations in the Globular C-Terminal Domain of Lamin A/C ». *American Journal of Human Genetics* 66 (4): 1192-98. <https://doi.org/10.1086/302836>.
- Steensel, Bas van, et Andrew S. Belmont. 2017. « Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression ». *Cell* 169 (5): 780-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022>.
- Su, Bing, et Estela Jacinto. 2011. « Mammalian TOR Signaling to the AGC Kinases ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 46 (6): 527-47. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.618113>.

- Swift, Joe, Irena L. Ivanovska, Amnon Buxboim, Takamasa Harada, P. C. Dave P. Dingal, Joel Pinter, J. David Pajeroski, et al. 2013. « Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6149): 1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>.
- Tapley, Erin C., et Daniel A. Starr. 2013. « Connecting the Nucleus to the Cytoskeleton by SUN-KASH Bridges across the Nuclear Envelope ». *Current Opinion in Cell Biology* 25 (1): 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.014>.
- Tintelen, J. Peter van, Robert M. W. Hofstra, Hilga Katerberg, Tom Rossenbacker, Ans C. P. Wiesfeld, Gideon J. du Marchie Sarvaas, Arthur A. M. Wilde, et al. 2007. « High Yield of LMNA Mutations in Patients with Dilated Cardiomyopathy and/or Conduction Disease Referred to Cardiogenetics Outpatient Clinics ». *American Heart Journal* 154 (6): 1130-39. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.07.038>.
- Torvaldson, Elin, Vitaly Kochin, et John E. Eriksson. 2015. « Phosphorylation of Lamins Determine Their Structural Properties and Signaling Functions ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 6 (3): 166-71. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1017167>.
- Uhler, Caroline, et G. V. Shivashankar. 2017. « Regulation of Genome Organization and Gene Expression by Nuclear Mechanotransduction ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (12): 717-27. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.101>.
- Vantyghem, M. C., D. Vincent-Desplanques, F. Defrance-Faivre, J. Capeau, C. Fermon, A. S. Valat, O. Lascols, et al. 2008. « Fertility and Obstetrical Complications in Women with LMNA-Related Familial Partial Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (6): 2223-29. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2521>.
- Vantyghem, Marie-Christine, Anne-Sophie Balavoine, Claire Douillard, Frédérique Defrance, Lucile Dieudonne, Fanny Mouton, Christine Lemaire, et al. 2012. « How to Diagnose a Lipodystrophy Syndrome ». *Annales D'endocrinologie* 73 (3): 170-89. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2012.04.010>.
- Vigouroux, C., J. Magré, M. C. Vantyghem, C. Bourut, O. Lascols, S. Shackleton, D. J. Lloyd, et al. 2000. « Lamin A/C Gene: Sex-Determined Expression of Mutations in Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy and Absence of Coding Mutations in Congenital and Acquired Generalized Lipoatrophy ». *Diabetes* 49 (11): 1958-62.
- Vigouroux, Corinne, Anne-Claire Guénantin, Camille Vatier, Emilie Capel, Caroline Le Dour, Pauline Afonso, Guillaume Bidault, et al. 2018. « Lipodystrophic Syndromes Due to LMNA Mutations: Recent Developments on Biomolecular Aspects, Pathophysiological Hypotheses and Therapeutic Perspectives ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 9 (1): 235-48. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1456217>.
- Weterings, A. a. W., I. a. W. van Rijsingen, A. S. Plomp, A. H. Zwinderman, R. H. Lekanne Deprez, M. M. Mannens, M. A. van den Bergh Weerman, A. C. van der Wal, et S. J. Pinto-Sietsma. 2013. « A Novel Lamin A/C Mutation in a Dutch Family with Premature Atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 229 (1): 169-73. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.016>.
- Wicklund, Matthew P., et John T. Kissel. 2014. « The Limb-Girdle Muscular Dystrophies ». *Neurologic Clinics* 32 (3): 729-49, ix. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.005>.
- Yang, Liu, Martina Munck, Karthic Swaminathan, Larisa E. Kapinos, Angelika A. Noegel, et Sascha Neumann. 2013. « Mutations in LMNA Modulate the Lamin A--Nesprin-2 Interaction and Cause LINC Complex Alterations ». *PLoS One* 8 (8): e71850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071850>.
- Yoon, Mee-Sup, Chongben Zhang, Yuting Sun, Christopher J. Schoenherr, et Jie Chen. 2013. « Mechanistic Target of Rapamycin Controls Homeostasis of Adipogenesis ». *Journal of Lipid Research* 54 (8): 2166-73. <https://doi.org/10.1194/jlr.M037705>.
- Young, Jacques, Louise Morbois-Trabut, Béatrice Couzinet, Olivier Lascols, Elisabeth Dion, Véronique Béréziat, Bruno Fève, et al. 2005. « Type A Insulin Resistance Syndrome Revealing a Novel Lamin A Mutation ». *Diabetes* 54 (6): 1873-78.

Zhang, Hui H., Jingxiang Huang, Katrin Düvel, Bernard Boback, Shulin Wu, Rachel M. Squillace, Chin-Lee Wu, et Brendan D. Manning. 2009. « Insulin Stimulates Adipogenesis through the Akt-TSC2-MTORC1 Pathway ». *PLoS One* 4 (7): e6189.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006189>.

Liste des tableaux et des figures

Tableaux

Tableau 1 : Description des différents types de lipodystrophie génétique familiale	57
Tableau 2 : Comparaison des différentes définitions du syndrome métabolique	67
Tableau 3 : Données sur les lignées témoins de fibroblastes	76
Tableau 4 : Tableau décrivant les anticorps primaires utilisés en immunofluorescence et en Western Blotting	80
Tableau 5 : Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée	82
Tableau 6 : Amorces utilisées pour le séquençage direct du cDNA LMNA	82
Tableau 7 : Séquence d'ARN interférent (siRNA) anti-lamine A et contrôle ('scrambled')	83
Tableau 8 : Description clinique et biologique des patients portant une mutation des gènes LMNA et ZMPSTE24 (NP : non présent)	94
Tableau 9 : Prédiction des différents logiciels d'analyse bio-informatique pour les différentes mutations du gène LMNA	103
Tableau 10 : Variants retrouvés en NGS chez les patients sans aucune mutations identifiées dans les gènes LMNA et ZMPSTE24	121

Figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire	9
Figure 2 : Description des différents types de lamines	12
Figure 3 : Représentation schématique de l'association des lamines.	13
Figure 4 : Modifications post-traductionnelles des lamines	15
Figure 5 : Rigidité nucléaire des différents tissus en fonction du ratio lamine A/lamine B	22
Figure 6 : Les différentes protéines à domaine LEM	25
Figure 7 : Représentation schématique de la protéine LBR	28
Figure 8 : Représentation schématique du complexe LINC	31
Figure 9 : Développement des différents types de tissu adipeux.	36
Figure 10 : Développement du tissu adipeux blanc	37
Figure 11 : Description clinique des laminopathies tissu-spécifiques et multi-systémiques	46
Figure 12 : Evolution de la dysmorphie faciale chez des patients atteints de Progéria de Hutchinson Gilford entre l'âge de 1 an et 12 ans.	47
Figure 13 : Modifications post-traductionnelles de la progérine	48
Figure 14 : Facteurs intervenant dans la maturation du tissu adipeux et responsables des lipodystrophies monogéniques	55
Figure 15 : Arbre généalogique du patient 3	91
Figure 16 : Arbre généalogique du patient 4	92
Figure 17 : Différents profils d'anomalies nucléaires observés sur les fibroblastes du patient 1 en immunofluorescence (Grossissement x100)	97
Figure 18 : Temps de doublement de population mesuré entre les passages P10 et P23 pour les fibroblastes témoins et les fibroblastes du patient 1(n=3).	98
Figure 19 : Mesure de l'incorporation BrdU dans les fibroblastes témoins et les fibroblastes mutés ZMPSTE24 (n=6)	99
Figure 20 : Mesure de l'activité β-galactosidase sur les fibroblastes contrôles et les fibroblastes mutés ZMPSTE24 après traitement par siRNAs (n=5).	100
Figure 21 : Quantification par Western Blot de la quantité de lamine A traduite après traitement par siRNAs sur les fibroblastes du patient muté ZMPSTE24 (n=3)	101
Figure 22 : Pourcentage d'anomalies nucléaires observées en immunofluorescence après traitement par siRNAs (n=4).	102
Figure 23 : Pourcentage des anomalies nucléaires sur les fibroblastes de patients et contrôle.	104
Figure 24 : Pourcentage d'anomalies nucléaires après transfection transitoire de plasmides exprimant une prélamine A sauvage ou mutée dans des cellules endothéliales (n=4).	106
Figure 25 : Pourcentage d'anomalies nucléaires après transfection transitoire de plasmides exprimant une prélamine A sauvage ou mutée dans des fibroblastes (n=5). 106	
Figure 26 : Quantification par Western Blot de la quantité de lamine A traduite après traitement par siRNAs sur les fibroblastes du patient 3 (n=4).	107
Figure 27 : Pourcentage d'anomalies nucléaires observées en immunofluorescence après traitement par siRNAs (n=4).	108

Figure 28 : Temps de doublement de population mesuré sur les fibroblastes contrôle et les fibroblastes portant une mutation du gène LMNA (n=3).	109
Figure 29 : Mesure de l'incorporation du BrdU dans les fibroblastes témoins (n=5) et les fibroblastes mutés LMNA.	110
Figure 30 : Mesure de l'activité β-galactosidase sur les fibroblastes contrôles et les fibroblastes mutés LMNA (n=5).	111
Figure 31 : Production de β-galactosidase mesurée sur les fibroblastes contrôles et des patient 3 et 4 non traités ou traités par siRNAs (n=5)	112
Figure 32 : Temps de doublement de population mesuré dans les fibroblastes des patients sans aucune mutation identifiée (n=3)	114
Figure 33 : Mesure de l'incorporation de BrdU dans les fibroblastes témoins et les fibroblastes ne possédant pas de mutation identifiée (n=5).	115
Figure 34 : Production de bêta-galactosidase mesurée sur les fibroblastes contrôle et des patients avec aucune mutation identifiée (n=5)	116
Figure 35 : Production de β-galactosidase mesurée sur les fibroblastes contrôles et sur les fibroblastes des patients 5, 6, 7, 8 et 9 traités ou non traités par siRNAs.	118
Figure 36 : Pourcentage d'anomalies nucléaires observées en immunofluorescence après traitement par siRNAs (n=5)	119

Références bibliographiques

- Abe, Akiko, Chikahiko Numakura, Kazuki Kijima, Makiko Hayashi, Taeko Hashimoto, et Kiyoshi Hayasaka. 2011. « Molecular Diagnosis and Clinical Onset of Charcot-Marie-Tooth Disease in Japan ». *Journal of Human Genetics* 56 (5): 364-68. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.20>.
- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle, et L. Gerace. 1986. « The Nuclear Lamina Is a Meshwork of Intermediate-Type Filaments ». *Nature* 323 (6088): 560-64. <https://doi.org/10.1038/323560a0>.
- Agarwal, Anil K., Jean-Pierre Fryns, Richard J. Auchus, et Abhimanyu Garg. 2003. « Zinc Metalloproteinase, ZMPSTE24, Is Mutated in Mandibuloacral Dysplasia ». *Human Molecular Genetics* 12 (16): 1995-2001.
- Ahmed, Muhammad Saad, Sana Ikram, Nousheen Bibi, et Asif Mir. 2017. « Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease ». *Molecular Neurobiology*, juin. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0610-7>.
- Akey, C. W. 1989. « Interactions and Structure of the Nuclear Pore Complex Revealed by Cryo-Electron Microscopy ». *The Journal of Cell Biology* 109 (3): 955-70.
- Alam, Uazman, Omar Asghar, Shazli Azmi, et Rayaz A. Malik. 2014. « General Aspects of Diabetes Mellitus ». *Handbook of Clinical Neurology* 126: 211-22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1>.
- Alberti, K. G. M. M., P. Zimmet, et J. Shaw. 2006. « Metabolic Syndrome--a New World-Wide Definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation ». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 23 (5): 469-80. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>.
- Alberti, K. G., et P. Z. Zimmet. 1998. « Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation ». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 15 (7): 539-53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S).
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. « An Overview of the Cell Cycle ». *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>.
- Ambonville, C., M.-A. Bouldouyre, P. Laforêt, P. Richard, O. Benveniste, et C. Vigouroux. 2017. « [A complex case of diabetes due to LMNA mutation] ». *La Revue De Medecine Interne* 38 (10): 695-99. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2017.04.006>.
- Araco, Marco, Marco Merlo, Gerald Carr-White, et Gianfranco Sinagra. 2017. « Genetic Bases of Dilated Cardiomyopathy ». *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.)* 18 (3): 123-30. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000432>.
- Arsenovic, Paul T., Iswarya Ramachandran, Kranthidhar Bathula, Ruijun Zhu, Jiten D. Narang, Natalie A. Noll, Christopher A. Lemmon, Gregg G. Gundersen, et Daniel E. Conway. 2016. « Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension ». *Biophysical Journal* 110 (1): 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.014>.
- Astapova, Olga, et Todd Leff. 2014. « PPAR γ Mutations, Lipodystrophy and Diabetes ». *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 20 (2): 63-70. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0033>.
- Barrowman, Jemima, Patricia A. Wiley, Sarah E. Hudon-Miller, Christine A. Hrycyna, et Susan Michaelis. 2012. « Human ZMPSTE24 Disease Mutations: Residual Proteolytic

- Activity Correlates with Disease Severity ». *Human Molecular Genetics* 21 (18): 4084-93. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds233>.
- Bemmel, Joke G. van, Ludo Pagie, Ulrich Braunschweig, Wim Brugman, Wouter Meuleman, Ron M. Kerkhoven, et Bas van Steensel. 2010. « The Insulator Protein SU(HW) Fine-Tunes Nuclear Lamina Interactions of the Drosophila Genome ». *PloS One* 5 (11): e15013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015013>.
- Ben-Harush, Kfir, Naama Wiesel, Daphna Frenkiel-Krispin, Dorothee Moeller, Eyal Soreq, Ueli Aebi, Harald Herrmann, Yosef Gruenbaum, et Ohad Medalia. 2009. « The Supramolecular Organization of the C. Elegans Nuclear Lamin Filament ». *Journal of Molecular Biology* 386 (5): 1392-1402. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.024>.
- Berk, Jason M., Kathryn E. Tifft, et Katherine L. Wilson. 2013. « The Nuclear Envelope LEM-Domain Protein Emerin ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 4 (4): 298-314. <https://doi.org/10.4161/nucl.25751>.
- Bilgic Gazioglu, Sema, Gokce Akan, Fatma Atalar, et Gaye Erten. 2015. « PAI-1 and TNF- α Profiles of Adipose Tissue in Obese Cardiovascular Disease Patients ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (12): 15919-25.
- Blackburn, Elizabeth H., Elissa S. Epel, et Jue Lin. 2015. « Human Telomere Biology: A Contributory and Interactive Factor in Aging, Disease Risks, and Protection ». *Science (New York, N.Y.)* 350 (6265): 1193-98. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>.
- Boguslavsky, Revekka L., Colin L. Stewart, et Howard J. Worman. 2006. « Nuclear Lamin A Inhibits Adipocyte Differentiation: Implications for Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy ». *Human Molecular Genetics* 15 (4): 653-63. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi480>.
- Bolsoni-Lopes, Andressa, et Maria Isabel C. Alonso-Vale. 2015. « Lipolysis and Lipases in White Adipose Tissue - An Update ». *Archives of Endocrinology and Metabolism* 59 (4): 335-42. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000067>.
- Bonello-Palot, Nathalie, Stéphanie Simoncini, Stéphane Robert, Patrice Bourgeois, Florence Sabatier, Nicolas Levy, Françoise Dignat-George, et Catherine Badens. 2014. « Prelamin A Accumulation in Endothelial Cells Induces Premature Senescence and Functional Impairment ». *Atherosclerosis* 237 (1): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.036>.
- Bonne, G., M. R. Di Barletta, S. Varnous, H. M. Bécane, E. H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, et al. 1999. « Mutations in the Gene Encoding Lamin A/C Cause Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 21 (3): 285-88. <https://doi.org/10.1038/6799>.
- Bonne, Gisèle, et Susana Quijano-Roy. 2013. « Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, Laminopathies, and Other Nuclear Envelopopathies ». *Handbook of Clinical Neurology* 113: 1367-76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00007-1>.
- Boudreau, Émilie, Sarah Labib, Anne T. Bertrand, Valérie Decostre, Pierrette M. Bolongo, Nicolas Sylvius, Gisèle Bonne, et Frédérique Tesson. 2012. « Lamin A/C Mutants Disturb Sumo1 Localization and Sumoylation in Vitro and in Vivo ». *PloS One* 7 (9): e45918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045918>.
- Bouhouche, A., A. Benomar, N. Birouk, A. Mularoni, F. Meggouh, J. Tassin, D. Grid, et al. 1999. « A Locus for an Axonal Form of Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Disease Maps to Chromosome 1q21.2-Q21.3 ». *American Journal of Human Genetics* 65 (3): 722-27. <https://doi.org/10.1086/302542>.
- Brachner, Andreas, Juliane Braun, Medini Ghodgaonkar, Dennis Castor, Livija Zlopasa, Veronika Ehrlich, Josef Jiricny, Josef Gotzmann, Siegfried Knasmüller, et Roland Foisner. 2012. « The Endonuclease Ankle1 Requires Its LEM and GIY-YIG Motifs

- for DNA Cleavage in Vivo ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 4): 1048-57.
<https://doi.org/10.1242/jcs.098392>.
- Brachner, Andreas, et Roland Foisner. 2011. « Evolvement of LEM Proteins as Chromatin Tethers at the Nuclear Periphery ». *Biochemical Society Transactions* 39 (6): 1735-41.
<https://doi.org/10.1042/BST20110724>.
- . 2014. « Lamina-Associated Polypeptide (LAP)2 α and Other LEM Proteins in Cancer Biology ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 773: 143-63.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_7.
- Brand, Martin D., et David G. Nicholls. 2011. « Assessing Mitochondrial Dysfunction in Cells ». *The Biochemical Journal* 435 (2): 297-312.
<https://doi.org/10.1042/BJ20110162>.
- Brasaemle, Dawn L., Vidya Subramanian, Anne Garcia, Amy Marcinkiewicz, et Alexis Rothenberg. 2009. « Perilipin A and the Control of Triacylglycerol Metabolism ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 326 (1-2): 15-21.
<https://doi.org/10.1007/s11010-008-9998-8>.
- Broers, J. L. V., F. C. S. Ramaekers, G. Bonne, R. Ben Yaou, et C. J. Hutchison. 2006. « Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing ». *Physiological Reviews* 86 (3): 967-1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2005>.
- Brown, Rebecca J., Areli Valencia, Megan Startzell, Elaine Cochran, Peter J. Walter, H. Martin Garraffo, Hongyi Cai, et al. 2018. « Metreleptin-Mediated Improvements in Insulin Sensitivity Are Independent of Food Intake in Humans with Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (8): 3504-16.
<https://doi.org/10.1172/JCI95476>.
- Buxboim, Amnon, Joe Swift, Jerome Irianto, Kyle R. Spinler, P. C. Dave P. Dingal, Avathamsa Athirasala, Yun-Ruei C. Kao, et al. 2014. « Matrix Elasticity Regulates Lamin-A,C Phosphorylation and Turnover with Feedback to Actomyosin ». *Current Biology: CB* 24 (16): 1909-17. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.001>.
- Cain, Natalie E., Erin C. Tapley, Kent L. McDonald, Benjamin M. Cain, et Daniel A. Starr. 2014. « The SUN Protein UNC-84 Is Required Only in Force-Bearing Cells to Maintain Nuclear Envelope Architecture ». *The Journal of Cell Biology* 206 (2): 163-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.201405081>.
- Campeau, Philippe M., Olga Astapova, Rebecca Martins, Jean Bergeron, Patrick Couture, Robert A. Hegele, Todd Leff, et Claude Gagné. 2012. « Clinical and Molecular Characterization of a Severe Form of Partial Lipodystrophy Expanding the Phenotype of PPAR γ Deficiency ». *Journal of Lipid Research* 53 (9): 1968-78.
<https://doi.org/10.1194/jlr.P025437>.
- Capanni, Cristina, Elisabetta Mattioli, Marta Columbaro, Enrico Lucarelli, Veena K. Parnaik, Giuseppe Novelli, Manfred Wehnert, et al. 2005. « Altered Pre-Lamin A Processing Is a Common Mechanism Leading to Lipodystrophy ». *Human Molecular Genetics* 14 (11): 1489-1502. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi158>.
- Captur, Gabriella, Eloisa Arbustini, Gisèle Bonne, Petros Syrris, Kevin Mills, Karim Wahbi, Saidi A. Mohiddin, et al. 2017. « Lamin and the Heart ». *Heart (British Cardiac Society)*, novembre. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-312338>.
- Caputo, Sandrine, Joël Couprie, Isabelle Duband-Goulet, Emilie Kondé, Feng Lin, Sandrine Braud, Muriel Gondry, Bernard Gilquin, Howard J. Worman, et Sophie Zinn-Justin. 2006. « The Carboxyl-Terminal Nucleoplasmic Region of MAN1 Exhibits a DNA Binding Winged Helix Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (26): 18208-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601980200>.

- Cartwright, Sarah, et Iakowos Karakesisoglou. 2014. « Nesprins in Health and Disease ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29 (mai): 169-79. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.12.010>.
- Casavalle, Patricia L., Fima Lifshitz, Laura S. Romano, Marcela Pandolfo, Anabella Caamaño, Patricia M. Boyer, Patricia N. Rodríguez, et Silvia M. Friedman. 2014. « Prevalence of Dyslipidemia and Metabolic Syndrome Risk Factor in Overweight and Obese Children ». *Pediatric Endocrinology Reviews: PER* 12 (2): 213-23.
- Cassini, Thomas A., Amy K. Robertson, Anna G. Bican, Joy D. Cogan, Vickie L. Hannig, John H. Newman, Rizwan Hamid, John A. Phillips, et Undiagnosed Diseases Network. 2018. « Phenotypic Heterogeneity of ZMPSTE24 Deficiency ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 176 (5): 1175-79. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38493>.
- Cau, Pierre, Claire Navarro, Karim Harhour, Patrice Roll, Sabine Sigaudy, Elise Kaspi, Sophie Perrin, Annachiara De Sandre-Giovannoli, et Nicolas Lévy. 2014. « Nuclear Matrix, Nuclear Envelope and Premature Aging Syndromes in a Translational Research Perspective ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29 (mai): 125-47. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.021>.
- Cenni, V., P. Sabatelli, E. Mattioli, S. Marmioli, C. Capanni, A. Ognibene, S. Squarzone, et al. 2005. « Lamin A N-Terminal Phosphorylation Is Associated with Myoblast Activation: Impairment in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Journal of Medical Genetics* 42 (3): 214-20. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.026112>.
- Cenni, Vittoria, Jessika Bertacchini, Francesca Beretti, Giovanna Lattanzi, Alberto Bavelloni, Massimo Riccio, Maria Ruzzene, et al. 2008. « Lamin A Ser404 Is a Nuclear Target of Akt Phosphorylation in C2C12 Cells ». *Journal of Proteome Research* 7 (11): 4727-35. <https://doi.org/10.1021/pr800262g>.
- Cenni, Vittoria, Maria Rosaria D'Apice, Paolo Garagnani, Marta Columbaro, Giuseppe Novelli, Claudio Franceschi, et Giovanna Lattanzi. 2018. « Mandibuloacral Dysplasia: A Premature Ageing Disease with Aspects of Physiological Ageing ». *Ageing Research Reviews* 42 (mars): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.001>.
- Chang, Wakam, Susumu Antoku, Cecilia Östlund, Howard J. Worman, et Gregg G. Gundersen. 2015. « Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) Complex-Mediated Actin-Dependent Nuclear Positioning Orients Centrosomes in Migrating Myoblasts ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 6 (1): 77-88. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1004947>.
- Chatzifrangkeskou, Maria, Gisèle Bonne, et Antoine Muchir. 2015. « Nuclear Envelope and Striated Muscle Diseases ». *Current Opinion in Cell Biology* 32 (février): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.007>.
- Chaudhry, Hammad S., et Steve S. Bhimji. 2017. « Cushing Syndrome ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470218/>.
- Chen, Jeng-Ting, Chia-Wen Ho, Lang-Ming Chi, Kun-Yi Chien, Ya-Ju Hsieh, Shih-Jie Lin, et Jau-Song Yu. 2013. « Identification of the Lamin A/C Phosphoepitope Recognized by the Antibody P-STM in Mitotic HeLa S3 Cells ». *BMC Biochemistry* 14 (juillet): 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-14-18>.
- Choi, Jason C., et Howard J. Worman. 2014. « Nuclear Envelope Regulation of Signaling Cascades ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 773: 187-206. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_9.
- Cinti, Saverio, Grant Mitchell, Giorgio Barbatelli, Incoronata Murano, Enzo Ceresi, Emanuela Faloi, Shupe Wang, Melanie Fortier, Andrew S. Greenberg, et Martin S. Obin. 2005. « Adipocyte Death Defines Macrophage Localization and Function in

- Adipose Tissue of Obese Mice and Humans ». *Journal of Lipid Research* 46 (11): 2347-55. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>.
- Coffinier, Catherine, Sarah E. Hudon, Emily A. Farber, Sandy Y. Chang, Christine A. Hrycyna, Stephen G. Young, et Loren G. Fong. 2007. « HIV Protease Inhibitors Block the Zinc Metalloproteinase ZMPSTE24 and Lead to an Accumulation of Prelamin A in Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (33): 13432-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704212104>.
- Crisp, Melissa, Qian Liu, Kyle Roux, J. B. Rattner, Catherine Shanahan, Brian Burke, Phillip D. Stahl, et Didier Hodzic. 2006. « Coupling of the Nucleus and Cytoplasm: Role of the LINC Complex ». *The Journal of Cell Biology* 172 (1): 41-53. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509124>.
- Crujeiras, Ana B., Marcos C. Carreira, Begoña Cabia, Sara Andrade, Maria Amil, et Felipe F. Casanueva. 2015. « Leptin Resistance in Obesity: An Epigenetic Landscape ». *Life Sciences* 140 (novembre): 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.003>.
- Cypess, Aaron M., Sanaz Lehman, Gethin Williams, Ilan Tal, Dean Rodman, Allison B. Goldfine, Frank C. Kuo, et al. 2009. « Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans ». *The New England Journal of Medicine* 360 (15): 1509-17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>.
- D'Amico, A., G. Haliloglu, P. Richard, B. Talim, S. Maugenre, A. Ferreira, P. Guicheney, et al. 2005. « Two Patients with “Dropped Head Syndrome” Due to Mutations in LMNA or SEPN1 Genes ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 15 (8): 521-24. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.03.006>.
- Dardour, J.-C. 2012. « [New anatomo clinic approach of adipose tissue] ». *Annales De Chirurgie Plastique Et Esthetique* 57 (5): 454-64. <https://doi.org/10.1016/j.anplas.2012.05.004>.
- De Sandre-Giovannoli, Annachiara, Rafaëlle Bernard, Pierre Cau, Claire Navarro, Jeanne Amiel, Irène Boccaccio, Stanislas Lyonnet, et al. 2003. « Lamin a Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5628): 2055. <https://doi.org/10.1126/science.1084125>.
- De Sandre-Giovannoli, Annachiara, Malika Chaouch, Serguei Kozlov, Jean-Michel Vallat, Meriem Tazir, Nadia Kassouri, Pierre Szepetowski, et al. 2002. « Homozygous Defects in LMNA, Encoding Lamin A/C Nuclear-Envelope Proteins, Cause Autosomal Recessive Axonal Neuropathy in Human (Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2) and Mouse ». *American Journal of Human Genetics* 70 (3): 726-36. <https://doi.org/10.1086/339274>.
- De Vos, Winnok H., Frederik Houben, Ron A. Hoebe, Raoul Hennekam, Baziel van Engelen, Erik M. M. Manders, Frans C. S. Ramaekers, Jos L. V. Broers, et Patrick Van Oostveldt. 2010. « Increased Plasticity of the Nuclear Envelope and Hypermobility of Telomeres Due to the Loss of A-Type Lamins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (4): 448-58. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.002>.
- Decaudain, Aurélie, Marie-Christine Vantyghem, Bruno Guerci, Annie-Claude Hécart, Martine Auclair, Yves Reznik, Hervé Narbonne, et al. 2007. « New Metabolic Phenotypes in Laminopathies: LMNA Mutations in Patients with Severe Metabolic Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (12): 4835-44. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0654>.
- Dechat, Thomas, Stephen A. Adam, Pekka Taimen, Takeshi Shimi, et Robert D. Goldman. 2010. « Nuclear Lamins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a000547. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000547>.

- Decker, Michelle L., Elizabeth Chavez, Irma Vulto, et Peter M. Lansdorp. 2009. « Telomere Length in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome ». *Mechanisms of Ageing and Development* 130 (6): 377-83. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.03.001>.
- Desvignes, Jean-Pierre, Marc Bartoli, Valérie Delague, Martin Krahn, Morgane Miltgen, Christophe Bérout, et David Salgado. 2018. « VarAFT: A Variant Annotation and Filtration System for Human next Generation Sequencing Data ». *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W545-53. <https://doi.org/10.1093/nar/gky471>.
- Dhe-Paganon, Sirano, Eric D. Werner, Young-In Chi, et Steven E. Shoelson. 2002. « Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 17381-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200038200>.
- Dittmer, Travis A., et Tom Misteli. 2011. « The Lamin Protein Family ». *Genome Biology* 12 (5): 222. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-222>.
- Dittrich, Christina M., Katja Kratz, Ataman Sendoel, Yosef Gruenbaum, Josef Jiricny, et Michael O. Hengartner. 2012. « LEM-3 - A LEM Domain Containing Nuclease Involved in the DNA Damage Response in *C. Elegans* ». *PLoS One* 7 (2): e24555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024555>.
- Domínguez-Gerpe, Lourdes, et David Araújo-Vilar. 2008. « Prematurely Aged Children: Molecular Alterations Leading to Hutchinson-Gilford Progeria and Werner Syndromes ». *Current Aging Science* 1 (3): 202-12.
- Dunnigan, M. G., M. A. Cochrane, A. Kelly, et J. W. Scott. 1974. « Familial Lipodystrophic Diabetes with Dominant Transmission. A New Syndrome ». *The Quarterly Journal of Medicine* 43 (169): 33-48.
- Dutour, Anne, Patrice Roll, Bénédicte Gaborit, Sébastien Courier, Marie-Christine Alessi, David-Alexandre Tregouet, Fabien Angelis, et al. 2011. « High Prevalence of Laminopathies among Patients with Metabolic Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 20 (19): 3779-86. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr294>.
- Elkhatib, Razan, Guy Longepied, Marine Paci, Vincent Achard, Jean-Marie Grillo, Nicolas Levy, Michael J. Mitchell, et Catherine Metzler-Guillemain. 2015. « Nuclear Envelope Remodelling during Human Spermiogenesis Involves Somatic B-Type Lamins and a Spermatid-Specific B3 Lamin Isoform ». *Molecular Human Reproduction* 21 (3): 225-36. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau111>.
- Elzeneini, Eman, et Sara A. Wickström. 2017. « Lipodystrophic Laminopathy: Lamin A Mutation Relaxes Chromatin Architecture to Impair Adipogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 216 (9): 2607-10. <https://doi.org/10.1083/jcb.201707090>.
- Enerbäck, S. 2010. « Brown Adipose Tissue in Humans ». *International Journal of Obesity* (2005) 34 Suppl 1 (octobre): S43-46. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.183>.
- Eriksson, Maria, W. Ted Brown, Leslie B. Gordon, Michael W. Glynn, Joel Singer, Laura Scott, Michael R. Erdos, et al. 2003. « Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome ». *Nature* 423 (6937): 293-98. <https://doi.org/10.1038/nature01629>.
- Esposito, Katherine, Annalisa Capuano, et Dario Giugliano. 2014. « Metabolic Syndrome and Cancer: Holistic or Reductionist? ». *Endocrine* 45 (3): 362-64. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0056-2>.
- Esteve Ràfols, Montserrat. 2014. « Adipose Tissue: Cell Heterogeneity and Functional Diversity ». *Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutrición* 61 (2): 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.011>.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001. « Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of

- High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III) ». *JAMA* 285 (19): 2486-97.
- Farhan, Sali M. K., John F. Robinson, Adam D. McIntyre, Maria G. Marrosu, Anna F. Ticca, Sara Loddo, Nicola Carboni, Francesco Brancati, et Robert A. Hegele. 2014. « A Novel LIPE Nonsense Mutation Found Using Exome Sequencing in Siblings with Late-Onset Familial Partial Lipodystrophy ». *The Canadian Journal of Cardiology* 30 (12): 1649-54. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.09.007>.
- Fatkin, D., C. MacRae, T. Sasaki, M. R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, et al. 1999. « Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin A/C Gene as Causes of Dilated Cardiomyopathy and Conduction-System Disease ». *The New England Journal of Medicine* 341 (23): 1715-24. <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412302>.
- Ferraro, A., M. Eufemi, L. Cervoni, R. Marinetti, et C. Turano. 1989. « Glycosylated Forms of Nuclear Lamins ». *FEBS Letters* 257 (2): 241-46.
- Florwick, Alyssa, Tejas Dharmaraj, Julie Jurgens, David Valle, et Katherine L. Wilson. 2017. « LMNA Sequences of 60,706 Unrelated Individuals Reveal 132 Novel Missense Variants in A-Type Lamins and Suggest a Link between Variant p.G602S and Type 2 Diabetes ». *Frontiers in Genetics* 8: 79. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00079>.
- Flotho, Annette, et Frauke Melchior. 2013. « Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 82: 357-85. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061909-093311>.
- Ford, Earl S., Wayne H. Giles, et William H. Dietz. 2002. « Prevalence of the Metabolic Syndrome among US Adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey ». *JAMA* 287 (3): 356-59.
- Frohnert, Cornelia, Stephanie Schweizer, et Sigrid Hoyer-Fender. 2011. « SPAG4L/SPAG4L-2 Are Testis-Specific SUN Domain Proteins Restricted to the Apical Nuclear Envelope of Round Spermatids Facing the Acrosome ». *Molecular Human Reproduction* 17 (4): 207-18. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq099>.
- Galant, Damien, Bénédicte Gaborit, Camille Desgrouas, Ines Abdesselam, Monique Bernard, Nicolas Levy, Françoise Merono, et al. 2016. « A Heterozygous ZMPSTE24 Mutation Associated with Severe Metabolic Syndrome, Ectopic Fat Accumulation, and Dilated Cardiomyopathy ». *Cells* 5 (2). <https://doi.org/10.3390/cells5020021>.
- Garg, A. 2000. « Lipodystrophies ». *The American Journal of Medicine* 108 (2): 143-52.
- Garg, Abhimanyu. 2004. « Acquired and Inherited Lipodystrophies ». *The New England Journal of Medicine* 350 (12): 1220-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMra025261>.
- Geiss-Friedlander, Ruth, et Frauke Melchior. 2007. « Concepts in Sumoylation: A Decade On ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12): 947-56. <https://doi.org/10.1038/nrm2293>.
- George, Stella, Justin J. Rochford, Christian Wolfrum, Sarah L. Gray, Sven Schinner, Jenny C. Wilson, Maria A. Soos, et al. 2004. « A Family with Severe Insulin Resistance and Diabetes Due to a Mutation in AKT2 ». *Science (New York, N.Y.)* 304 (5675): 1325-28. <https://doi.org/10.1126/science.1096706>.
- Gharipour, Mojgan, et Masoumeh Sadeghi. 2013. « Pivotal Role of MicroRNA-33 in Metabolic Syndrome: A Systematic Review ». *ARYA Atherosclerosis* 9 (6): 372-76.
- Giannios, Ioannis, Eleftheria Chatzantonaki, et Spyros Georgatos. 2017. « Dynamics and Structure-Function Relationships of the Lamin B Receptor (LBR) ». *PloS One* 12 (1): e0169626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169626>.
- Gilford, H. 1897. « On a Condition of Mixed Premature and Immature Development ». *Medico-Chirurgical Transactions* 80: 17-46.25.

- Göb, Eva, Johannes Schmitt, Ricardo Benavente, et Manfred Alsheimer. 2010. « Mammalian Sperm Head Formation Involves Different Polarization of Two Novel LINC Complexes ». *PloS One* 5 (8): e12072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012072>.
- González, José María, Ana Navarro-Puche, Berta Casar, Piero Crespo, et Vicente Andrés. 2008. « Fast Regulation of AP-1 Activity through Interaction of Lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the Nuclear Envelope ». *The Journal of Cell Biology* 183 (4): 653-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805049>.
- Gonzalez-Suarez, Ignacio, Abena B. Redwood, David A. Grotsky, Martin A. Neumann, Emily H.-Y. Cheng, Colin L. Stewart, Adriana Dusso, et Susana Gonzalo. 2011. « A New Pathway That Regulates 53BP1 Stability Implicates Cathepsin L and Vitamin D in DNA Repair ». *The EMBO Journal* 30 (16): 3383-96. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.225>.
- Gonzalez-Suarez, Ignacio, Abena B. Redwood, Stephanie M. Perkins, Bart Vermolen, Daniel Lichtensztejin, David A. Grotsky, Lucia Morgado-Palacin, et al. 2009. « Novel Roles for A-Type Lamins in Telomere Biology and the DNA Damage Response Pathway ». *The EMBO Journal* 28 (16): 2414-27. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.196>.
- Gonzalo, Susana. 2014. « DNA Damage and Lamins ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 773: 377-99. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_17.
- Gordon, Leslie B., Frank G. Rothman, Carlos López-Otín, et Tom Misteli. 2014. « Progeria: A Paradigm for Translational Medicine ». *Cell* 156 (3): 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.028>.
- Gruenbaum, Yosef, et Roland Foisner. 2015. « Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation ». *Annual Review of Biochemistry* 84: 131-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034115>.
- Guelen, Lars, Ludo Pagie, Emilie Brassat, Wouter Meuleman, Marius B. Faza, Wendy Talhout, Bert H. Eussen, et al. 2008. « Domain Organization of Human Chromosomes Revealed by Mapping of Nuclear Lamina Interactions ». *Nature* 453 (7197): 948-51. <https://doi.org/10.1038/nature06947>.
- Guénantin, A. C., N. Briand, G. Bidault, P. Afonso, V. Béréziat, C. Vazier, O. Lascols, M. Caron-Debarle, J. Capeau, et C. Vigouroux. 2014. « Nuclear Envelope-Related Lipodystrophies ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29 (mai): 148-57. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.12.015>.
- Guillín-Amarelle, Cristina, Antía Fernández-Pombo, Sofía Sánchez-Iglesias, et David Araújo-Vilar. 2018. « Lipodystrophic Laminopathies: Diagnostic Clues ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 9 (1): 249-60. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1454167>.
- Guilluy, Christophe, et Keith Burrridge. 2015. « Nuclear Mechanotransduction: Forcing the Nucleus to Respond ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 6 (1): 19-22. <https://doi.org/10.1080/19491034.2014.1001705>.
- Guilluy, Christophe, Lukas D. Osborne, Laurianne Van Landeghem, Lisa Sharek, Richard Superfine, Rafael Garcia-Mata, et Keith Burrridge. 2014. « Isolated Nuclei Adapt to Force and Reveal a Mechanotransduction Pathway in the Nucleus ». *Nature Cell Biology* 16 (4): 376-81. <https://doi.org/10.1038/ncb2927>.
- Gundersen, Gregg G., et Howard J. Worman. 2013. « Nuclear Positioning ». *Cell* 152 (6): 1376-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.031>.
- Guo, Yuxuan, Youngjo Kim, Takeshi Shimi, Robert D. Goldman, et Yixian Zheng. 2014. « Concentration-Dependent Lamin Assembly and Its Roles in the Localization of Other Nuclear Proteins ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (8): 1287-97. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-11-0644>.

- Guzman, Nilmarie, et Ahmad M. Al Aboud. 2018. « HIV-Associated Lipodystrophy ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493183/>.
- Haas, Jan, Karen S. Frese, Barbara Peil, Wanda Kloos, Andreas Keller, Rouven Nietsch, Zhu Feng, et al. 2015. « Atlas of the Clinical Genetics of Human Dilated Cardiomyopathy ». *European Heart Journal* 36 (18): 1123-35. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu301>.
- Haas, M., et E. Jost. 1993. « Functional Analysis of Phosphorylation Sites in Human Lamin A Controlling Lamin Disassembly, Nuclear Transport and Assembly ». *European Journal of Cell Biology* 62 (2): 237-47.
- Haffner, S. M., R. A. Valdez, H. P. Hazuda, B. D. Mitchell, P. A. Morales, et M. P. Stern. 1992. « Prospective Analysis of the Insulin-Resistance Syndrome (Syndrome X) ». *Diabetes* 41 (6): 715-22.
- Halberg, Nils, Ingrid Wernstedt-Asterholm, et Philipp E. Scherer. 2008. « The Adipocyte as an Endocrine Cell ». *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37 (3): 753-68, x-xi. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.07.002>.
- Halcox, Julian, et Anoop Misra. 2015. « Type 2 Diabetes Mellitus, Metabolic Syndrome, and Mixed Dyslipidemia: How Similar, How Different, and How to Treat? » *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 13 (1): 1-21. <https://doi.org/10.1089/met.2014.0049>.
- Handoko, Lusy, Han Xu, Guoliang Li, Chew Yee Ngan, Elaine Chew, Marie Schnapp, Charlie Wah Heng Lee, et al. 2011. « CTCF-Mediated Functional Chromatin Interactome in Pluripotent Cells ». *Nature Genetics* 43 (7): 630-38. <https://doi.org/10.1038/ng.857>.
- Hayashi, Makoto T. 2018. « Telomere Biology in Aging and Cancer: Early History and Perspectives ». *Genes & Genetic Systems* 92 (3): 107-18. <https://doi.org/10.1266/ggs.17-00010>.
- Heald, R., et F. McKeon. 1990. « Mutations of Phosphorylation Sites in Lamin A That Prevent Nuclear Lamina Disassembly in Mitosis ». *Cell* 61 (4): 579-89.
- Hegele, R. A. 2000. « Familial Partial Lipodystrophy: A Monogenic Form of the Insulin Resistance Syndrome ». *Molecular Genetics and Metabolism* 71 (4): 539-44. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3092>.
- Hegele, Robert A., Henian Cao, Carol M. Anderson, et Irene M. Hramiak. 2000. « Heterogeneity of Nuclear Lamin A Mutations in Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 (9): 3431-35. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6822>.
- Heid, Hans W., et Thomas W. Keenan. 2005. « Intracellular Origin and Secretion of Milk Fat Globules ». *European Journal of Cell Biology* 84 (2-3): 245-58. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2004.12.002>.
- Hellemans, Jan, Olena Preobrazhenska, Andy Willaert, Philippe Debeer, Peter C. M. Verdonk, Teresa Costa, Katrien Janssens, et al. 2004. « Loss-of-Function Mutations in LEMD3 Result in Osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff Syndrome and Melorheostosis ». *Nature Genetics* 36 (11): 1213-18. <https://doi.org/10.1038/ng1453>.
- Hershberger, Ray E., Dale J. Hedges, et Ana Morales. 2013. « Dilated Cardiomyopathy: The Complexity of a Diverse Genetic Architecture ». *Nature Reviews. Cardiology* 10 (9): 531-47. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.105>.
- Hirano, Yasuhiro, Kohji Hizume, Hiroshi Kimura, Kunio Takeyasu, Tokuko Haraguchi, et Yasushi Hiraoka. 2012. « Lamin B Receptor Recognizes Specific Modifications of Histone H4 in Heterochromatin Formation ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (51): 42654-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397950>.

- Hiraoka, Yasushi, et Abby F. Dernburg. 2009. « The SUN Rises on Meiotic Chromosome Dynamics ». *Developmental Cell* 17 (5): 598-605. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.014>.
- Horn, Henning F. 2014. « LINC Complex Proteins in Development and Disease ». *Current Topics in Developmental Biology* 109: 287-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00004-4>.
- Horn, Henning F., Zippora Brownstein, Danielle R. Lenz, Shaked Shivatzki, Amiel A. Dror, Orit Dagan-Rosenfeld, Lilach M. Friedman, et al. 2013. « The LINC Complex Is Essential for Hearing ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2): 740-50. <https://doi.org/10.1172/JCI66911>.
- Hosoki, Kana, Tsutomu Ogata, Masayo Kagami, Touju Tanaka, et Shinji Saitoh. 2008. « Epimutation (Hypomethylation) Affecting the Chromosome 14q32.2 Imprinted Region in a Girl with Upd(14)Mat-like Phenotype ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 16 (8): 1019-23. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.90>.
- Hunter, T. 1995. « Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling ». *Cell* 80 (2): 225-36.
- Hussain, Iram, et Abhimanyu Garg. 2016. « Lipodystrophy Syndromes ». *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 45 (4): 783-97. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.012>.
- Hutchinson, J. 1886. « Congenital Absence of Hair and Mammary Glands with Atrophic Condition of the Skin and Its Appendages, in a Boy Whose Mother Had Been Almost Wholly Bald from Alopecia Areata from the Age of Six ». *Medico-Chirurgical Transactions* 69: 473-77.
- Jeninga, Ellen H., et Eric Kalkhoven. 2010. « Central Players in Inherited Lipodystrophies ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 21 (10): 581-88. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.006>.
- Jerath, Nivedita U., et Michael E. Shy. 2015. « Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: Understanding Molecular Pathogenesis Could Lead to Future Treatment Strategies ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1852 (4): 667-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.031>.
- Jeru, Isabelle, Camille Vatie, Marie-Christine Vantyghem, Olivier Lascols, et Corinne Vigouroux. 2017. « LMNA-Associated Partial Lipodystrophy: Anticipation of Metabolic Complications ». *Journal of Medical Genetics* 54 (6): 413-16. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104437>.
- Kakarougkas, A., et P. A. Jeggo. 2014. « DNA DSB Repair Pathway Choice: An Orchestrated Handover Mechanism ». *The British Journal of Radiology* 87 (1035): 20130685. <https://doi.org/10.1259/bjr.20130685>.
- Karastergiou, Kalypso. 2015. « The Interplay Between Sex, Ethnicity, and Adipose Tissue Characteristics ». *Current Obesity Reports* 4 (2): 269-78. <https://doi.org/10.1007/s13679-015-0149-8>.
- Kaur, Jaspinder. 2014. « A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome ». *Cardiology Research and Practice* 2014: 943162. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>.
- Ketema, Mirjam, Maaike Kreft, Pablo Secades, Hans Janssen, et Arnoud Sonnenberg. 2013. « Nesprin-3 Connects Plectin and Vimentin to the Nuclear Envelope of Sertoli Cells but Is Not Required for Sertoli Cell Function in Spermatogenesis ». *Molecular Biology of the Cell* 24 (15): 2454-66. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-02-0100>.
- King, Samantha J., Karolin Nowak, Narendra Suryavanshi, Ian Holt, Catherine M. Shanahan, et Anne J. Ridley. 2014. « Nesprin-1 and Nesprin-2 Regulate Endothelial Cell Shape and Migration ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 71 (7): 423-34. <https://doi.org/10.1002/cm.21182>.

- Koch, Adam J., et James M. Holaska. 2014. « Emerin in Health and Disease ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29 (mai): 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.12.008>.
- Kochin, Vitaly, Takeshi Shimi, Elin Torvaldson, Stephen A. Adam, Anne Goldman, Chan-Gi Pack, Johanna Melo-Cardenas, Susumu Y. Imanishi, Robert D. Goldman, et John E. Eriksson. 2014. « Interphase Phosphorylation of Lamin A ». *Journal of Cell Science* 127 (Pt 12): 2683-96. <https://doi.org/10.1242/jcs.141820>.
- Kondé, Emilie, Benjamin Bourgeois, Carine Tellier-Lebegue, Wei Wu, Javier Pérez, Sandrine Caputo, Wika Attanda, et al. 2010. « Structural Analysis of the Smad2-MAN1 Interaction That Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling at the Inner Nuclear Membrane ». *Biochemistry* 49 (37): 8020-32. <https://doi.org/10.1021/bi101153w>.
- Kozusko, K., Vhm Tsang, W. Bottomley, Y. H. Cho, S. Gandotra, M. L. Mimmack, K. Lim, et al. 2015. « Clinical and Molecular Characterization of a Novel PLIN1 Frameshift Mutation Identified in Patients with Familial Partial Lipodystrophy ». *Diabetes* 64 (1): 299-310. <https://doi.org/10.2337/db14-0104>.
- Krimm, Isabelle, Cecilia Ostlund, Bernard Gilquin, Joël Couprie, Paul Hossenlopp, Jean-Paul Mornon, Gisèle Bonne, Jean-Claude Courvalin, Howard J. Worman, et Sophie Zinn-Justin. 2002. « The Ig-like Structure of the C-Terminal Domain of Lamin A/C, Mutated in Muscular Dystrophies, Cardiomyopathy, and Partial Lipodystrophy ». *Structure (London, England: 1993)* 10 (6): 811-23.
- Kubben, Nard, Jan Willem Voncken, et Tom Misteli. 2010. « Mapping of Protein- and Chromatin-Interactions at the Nuclear Lamina ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 1 (6): 460-71. <https://doi.org/10.4161/nucl.1.6.13513>.
- Las Heras, Jose I. de, Nikolaj Zuleger, Dzmitry G. Batrakou, Rafal Czapiewski, Alastair R. W. Kerr, et Eric C. Schirmer. 2017. « Tissue-Specific NETs Alter Genome Organization and Regulation Even in a Heterologous System ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 8 (1): 81-97. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1261230>.
- Lau, David C. W., Bikramjit Dhillon, Hongyun Yan, Paul E. Szmitko, et Subodh Verma. 2005. « Adipokines: Molecular Links between Obesity and Atherosclerosis ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288 (5): H2031-2041. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01058.2004>.
- Law, James, Ian Bloor, Helen Budge, et Michael E. Symonds. 2014. « The Influence of Sex Steroids on Adipose Tissue Growth and Function ». *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 19 (1): 13-24. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0015>.
- Lawrence, Katherine S., Erin C. Tapley, Victor E. Cruz, Qianyan Li, Kayla Aung, Kevin C. Hart, Thomas U. Schwartz, Daniel A. Starr, et JoAnne Engebrecht. 2016. « LINC Complexes Promote Homologous Recombination in Part through Inhibition of Nonhomologous End Joining ». *The Journal of Cell Biology* 215 (6): 801-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.201604112>.
- Lee, K. K., Y. Gruenbaum, P. Spann, J. Liu, et K. L. Wilson. 2000. « C. Elegans Nuclear Envelope Proteins Emerin, MAN1, Lamin, and Nucleoporins Reveal Unique Timing of Nuclear Envelope Breakdown during Mitosis ». *Molecular Biology of the Cell* 11 (9): 3089-99.
- Lee, Kenneth K., et Katherine L. Wilson. 2004. « All in the Family: Evidence for Four New LEM-Domain Proteins Lem2 (NET-25), Lem3, Lem4 and Lem5 in the Human Genome ». *Symposia of the Society for Experimental Biology*, n° 56: 329-39.
- Lei, Kai, Xiaoqiang Zhu, Renner Xu, Chunlin Shao, Tian Xu, Yuan Zhuang, et Min Han. 2012. « Inner Nuclear Envelope Proteins SUN1 and SUN2 Play a Prominent Role in the

- DNA Damage Response ». *Current Biology: CB* 22 (17): 1609-15.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.043>.
- Li, Guohong, et Ping Zhu. 2015. « Structure and Organization of Chromatin Fiber in the Nucleus ». *FEBS Letters* 589 (20 Pt A): 2893-2904.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.023>.
- Libotte, Thorsten, Hafida Zaim, Sabu Abraham, V. C. Padmakumar, Maria Schneider, Wenshu Lu, Martina Munck, et al. 2005. « Lamin A/C-Dependent Localization of Nesprin-2, a Giant Scaffold at the Nuclear Envelope ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (7): 3411-24. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-1009>.
- Lin, H.-F., B. Boden-Albala, S. H. Juo, N. Park, T. Rundek, et R. L. Sacco. 2005. « Heritabilities of the Metabolic Syndrome and Its Components in the Northern Manhattan Family Study ». *Diabetologia* 48 (10): 2006-12.
<https://doi.org/10.1007/s00125-005-1892-2>.
- López-Otín, Carlos, María A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, et Guido Kroemer. 2013. « The Hallmarks of Aging ». *Cell* 153 (6): 1194-1217.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Lu, Wenshu, Josef Gotzmann, Lucia Sironi, Verena-Maren Jaeger, Maria Schneider, Yvonne Lüke, Mathias Uhlén, et al. 2008. « Sun1 Forms Immobile Macromolecular Assemblies at the Nuclear Envelope ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783 (12): 2415-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.001>.
- Machowska, Magdalena, Katarzyna Piekarowicz, et Ryszard Rzepecki. 2015. « Regulation of Lamin Properties and Functions: Does Phosphorylation Do It All? » *Open Biology* 5 (11). <https://doi.org/10.1098/rsob.150094>.
- Manju, Kaliyaperumal, Bhattiprolu Muralikrishna, et Veena K. Parnaik. 2006. « Expression of Disease-Causing Lamin A Mutants Impairs the Formation of DNA Repair Foci ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 13): 2704-14. <https://doi.org/10.1242/jcs.03009>.
- Mans, Ben J., Vivek Anantharaman, L. Aravind, et Eugene V. Koonin. 2004. « Comparative Genomics, Evolution and Origins of the Nuclear Envelope and Nuclear Pore Complex ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3 (12): 1612-37.
<https://doi.org/10.4161/cc.3.12.1345>.
- Mansharamani, Malini, et Katherine L. Wilson. 2005. « Direct Binding of Nuclear Membrane Protein MAN1 to Emerin in Vitro and Two Modes of Binding to Barrier-to-Autointegration Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 13863-70.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413020200>.
- Maron, Barry J., Jeffrey A. Towbin, Gaetano Thiene, Charles Antzelevitch, Domenico Corrado, Donna Arnett, Arthur J. Moss, et al. 2006. « Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention ». *Circulation* 113 (14): 1807-16.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287>.
- Martens, U. M., E. A. Chavez, S. S. Poon, C. Schmoor, et P. M. Lansdorp. 2000. « Accumulation of Short Telomeres in Human Fibroblasts Prior to Replicative Senescence ». *Experimental Cell Research* 256 (1): 291-99.
<https://doi.org/10.1006/excr.2000.4823>.
- McClintock, Dayle, Desiree Ratner, Meepa Lokuge, David M. Owens, Leslie B. Gordon, Francis S. Collins, et Karima Djabali. 2007. « The Mutant Form of Lamin A That Causes Hutchinson-Gilford Progeria Is a Biomarker of Cellular Aging in Human Skin ». *PloS One* 2 (12): e1269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001269>.

- McGown, Christine, Aybike Birerdinc, et Zobair M. Younossi. 2014. « Adipose Tissue as an Endocrine Organ ». *Clinics in Liver Disease* 18 (1): 41-58. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.012>.
- McKenna, William J., Barry J. Maron, et Gaetano Thiene. 2017. « Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies ». *Circulation Research* 121 (7): 722-30. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309711>.
- Mercuri, Eugenio, Maja Poppe, Ros Quinlivan, Sonia Messina, Maria Kinali, Laurence Demay, John Bourke, et al. 2004. « Extreme Variability of Phenotype in Patients with an Identical Missense Mutation in the Lamin A/C Gene: From Congenital Onset with Severe Phenotype to Milder Classic Emery-Dreifuss Variant ». *Archives of Neurology* 61 (5): 690-94. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.690>.
- Merideth, Melissa A., Leslie B. Gordon, Sarah Clauss, Vandana Sachdev, Ann C. M. Smith, Monique B. Perry, Carmen C. Brewer, et al. 2008. « Phenotype and Course of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome ». *The New England Journal of Medicine* 358 (6): 592-604. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706898>.
- Montenegro, Renan Magalhães, Aline Dantas Costa-Riquetto, Virgínia Oliveira Fernandes, Ana Paula Dias Rangel Montenegro, Lucas Santos de Santana, Alexander Augusto de Lima Jorge, Lia Beatriz de Azevedo Souza Karbage, et al. 2018. « Homozygous and Heterozygous Nuclear Lamin A p.R582C Mutation: Different Lipodystrophic Phenotypes in the Same Kindred ». *Frontiers in Endocrinology* 9: 458. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00458>.
- Moriuchi, Takanobu, Masaki Kuroda, Fumiya Kusumoto, Takashi Osumi, et Fumiko Hirose. 2016. « Lamin A Reassembly at the End of Mitosis Is Regulated by Its SUMO-Interacting Motif ». *Experimental Cell Research* 342 (1): 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.02.016>.
- Mory, Patricia B., Felipe Crispim, Maria Beatriz S. Freire, João Eduardo N. Salles, Cynthia M. Valério, Amelio F. Godoy-Matos, Sérgio A. Dib, et Regina S. Moisés. 2012. « Phenotypic Diversity in Patients with Lipodystrophy Associated with LMNA Mutations ». *European Journal of Endocrinology* 167 (3): 423-31. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0268>.
- Muchir, Antoine, et Howard J. Worman. 2010. « Signaling Defects and the Nuclear Envelope in Progeria ». *Developmental Cell* 19 (3): 355-56. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.019>.
- Mumm, Steven, Deborah Wenkert, Xiafang Zhang, William H. McAlister, Richard J. Mier, et Michael P. Whyte. 2007. « Deactivating Germline Mutations in LEMD3 Cause Osteopoikilosis and Buschke-Ollendorff Syndrome, but Not Sporadic Melorheostosis ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 22 (2): 243-50. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061102>.
- Murphy, Denis J. 2012. « The Dynamic Roles of Intracellular Lipid Droplets: From Archaea to Mammals ». *Protoplasma* 249 (3): 541-85. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7>.
- Muschke, Petra, Uwe Kölsch, Sibylle Jakubiczka, Ilse Wieland, Thomas Brune, et Peter Wieacker. 2007. « The Heterozygous LMNA Mutation p.R471G Causes a Variable Phenotype with Features of Two Types of Familial Partial Lipodystrophy ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 143A (23): 2810-14. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32046>.
- Musso, Giovanni, Roberto Gambino, et Maurizio Cassader. 2010. « Emerging Molecular Targets for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Annual Review of Medicine* 61: 375-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.101107.134820>.

- Navarro, Claire L., Pierre Cau, et Nicolas Lévy. 2006. « Molecular Bases of Progeroid Syndromes ». *Human Molecular Genetics* 15 Spec No 2 (octobre): R151-161. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl214>.
- Navarro, Claire L., Annachiara De Sandre-Giovannoli, Rafaëlle Bernard, Irène Boccaccio, Amandine Boyer, David Geneviève, Smail Hadj-Rabia, et al. 2004. « Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) Defects Cause Nuclear Disorganization and Identify Restrictive Dermopathy as a Lethal Neonatal Laminopathy ». *Human Molecular Genetics* 13 (20): 2493-2503. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh265>.
- Navarro, Claire Laure, Vera Esteves-Vieira, Sébastien Courier, Amandine Boyer, Thuy Duong Nguyen, Le Thi Thanh Huong, Peter Meinke, et al. 2014. « New ZMPSTE24 (FACE1) Mutations in Patients Affected with Restrictive Dermopathy or Related Progeroid Syndromes and Mutation Update ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 22 (8): 1002-11. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.258>.
- Nie, Si, Huimin Ke, Feng Gao, Jinqi Ren, Mingzhu Wang, Lin Huo, Weimin Gong, et Wei Feng. 2016. « Coiled-Coil Domains of SUN Proteins as Intrinsic Dynamic Regulators ». *Structure (London, England: 1993)* 24 (1): 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.10.024>.
- Nigro, Ersilia, Olga Scudiero, Maria Ludovica Monaco, Alessia Palmieri, Gennaro Mazzearella, Ciro Costagliola, Andrea Bianco, et Aurora Daniele. 2014. « New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases ». *BioMed Research International* 2014: 658913. <https://doi.org/10.1155/2014/658913>.
- Nilsson, S. 2001. « [Research contributions of Eskil Kylin] ». *Svensk Medicinhistorisk Tidskrift* 5 (1): 15-28.
- Nishioka, Yu, Hiromasa Imaizumi, Junko Imada, Jun Katahira, Nariaki Matsuura, et Miki Hieda. 2016. « SUN1 Splice Variants, SUN1_888, SUN1_785, and Predominant SUN1_916, Variably Function in Directional Cell Migration ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 7 (6): 572-84. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1260802>.
- Oldenburg, Anja, Nolwenn Briand, Anita L. Sørensen, Inswasti Cahyani, Akshay Shah, Jan Øivind Moskaug, et Philippe Collas. 2017. « A Lipodystrophy-Causing Lamin A Mutant Alters Conformation and Epigenetic Regulation of the Anti-Adipogenic MIR335 Locus ». *J Cell Biol* 216 (9): 2731-43. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701043>.
- Oshima, Junko, Julia M. Sidorova, et Raymond J. Monnat. 2017. « Werner Syndrome: Clinical Features, Pathogenesis and Potential Therapeutic Interventions ». *Ageing Research Reviews* 33 (janvier): 105-14. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.002>.
- Ostlund, C., J. Ellenberg, E. Hallberg, J. Lippincott-Schwartz, et H. J. Worman. 1999. « Intracellular Trafficking of Emerin, the Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Protein ». *Journal of Cell Science* 112 (Pt 11) (juin): 1709-19.
- Otto, Tamara C., et M. Daniel Lane. 2005. « Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40 (4): 229-42. <https://doi.org/10.1080/10409230591008189>.
- Panorchan, Porntula, Benjamin W. Schafer, Denis Wirtz, et Yiider Tseng. 2004. « Nuclear Envelope Breakdown Requires Overcoming the Mechanical Integrity of the Nuclear Lamina ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (42): 43462-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402474200>.
- Paz-Filho, Gilberto, Claudio A. Mastronardi, et Julio Licinio. 2015. « Leptin Treatment: Facts and Expectations ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 64 (1): 146-56. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.07.014>.
- Pendás, Alberto M., Zhongjun Zhou, Juan Cadiñanos, José M. P. Freije, Jianming Wang, Kjell Hultenby, Aurora Astudillo, et al. 2002. « Defective Prelamin A Processing and

- Muscular and Adipocyte Alterations in Zmpste24 Metalloproteinase-Deficient Mice ». *Nature Genetics* 31 (1): 94-99. <https://doi.org/10.1038/ng871>.
- Philip, Julia T., et Kris Noel Dahl. 2008. « Nuclear Mechanotransduction: Response of the Lamina to Extracellular Stress with Implications in Aging ». *Journal of Biomechanics* 41 (15): 3164-70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.08.024>.
- Pickersgill, Helen, Bernike Kalverda, Elzo de Wit, Wendy Talhout, Maarten Fornerod, et Bas van Steensel. 2006. « Characterization of the Drosophila Melanogaster Genome at the Nuclear Lamina ». *Nature Genetics* 38 (9): 1005-14. <https://doi.org/10.1038/ng1852>.
- Pradhan, A. D., J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, et P. M. Ridker. 2001. « C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus ». *JAMA* 286 (3): 327-34.
- Puckelwartz, Megan, et Elizabeth M. McNally. 2011. « Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy ». *Handbook of Clinical Neurology* 101: 155-66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00012-8>.
- Quigley, Andrew, Yin Yao Dong, Ashley C. W. Pike, Liang Dong, Leela Shrestha, Georgina Berridge, Phillip J. Stansfeld, et al. 2013. « The Structural Basis of ZMPSTE24-Dependent Laminopathies ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6127): 1604-7. <https://doi.org/10.1126/science.1231513>.
- Quijano-Roy, Susana, Blaise Mbieleu, Carsten G. Bönnemann, Pierre-Yves Jeannot, Jaume Colomer, Nigel F. Clarke, Jean-Marie Cuisset, et al. 2008. « De Novo LMNA Mutations Cause a New Form of Congenital Muscular Dystrophy ». *Annals of Neurology* 64 (2): 177-86. <https://doi.org/10.1002/ana.21417>.
- Rajgor, Dipen, et Catherine M. Shanahan. 2013. « Nesprins: From the Nuclear Envelope and Beyond ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15 (juillet): e5. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.6>.
- Raz, Vered, Bart J. Vermolen, Yuval Garini, Jos J. M. Onderwater, Mieke A. Mommaas-Kienhuis, Abraham J. Koster, Ian T. Young, Hans Tanke, et Roeland W. Dirks. 2008. « The Nuclear Lamina Promotes Telomere Aggregation and Centromere Peripheral Localization during Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 24): 4018-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.034876>.
- Reaven, G. M. 1988. « Banting Lecture 1988. Role of Insulin Resistance in Human Disease ». *Diabetes* 37 (12): 1595-1607.
- Redwood, Abena B., Stephanie M. Perkins, Robert P. Vanderwaal, Zhihui Feng, Kenneth J. Biehl, Ignacio Gonzalez-Suarez, Lucia Morgado-Palacin, et al. 2011. « A Dual Role for A-Type Lamins in DNA Double-Strand Break Repair ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (15): 2549-60. <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16531>.
- Rogne, M., et K. Taskén. 2014. « Compartmentalization of cAMP Signaling in Adipogenesis, Lipogenesis, and Lipolysis ». *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 46 (12): 833-40. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1389955>.
- Rosen, Evan D., et Ormond A. MacDougald. 2006. « Adipocyte Differentiation from the inside Out ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (12): 885-96. <https://doi.org/10.1038/nrm2066>.
- Rosenbaum, Michael, et Rudolph L. Leibel. 2014. « 20 Years of Leptin: Role of Leptin in Energy Homeostasis in Humans ». *The Journal of Endocrinology* 223 (1): T83-96. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0358>.
- Roux, Kyle J., Melissa L. Crisp, Qian Liu, Daein Kim, Serguei Kozlov, Colin L. Stewart, et Brian Burke. 2009. « Nesprin 4 Is an Outer Nuclear Membrane Protein That Can Induce Kinesin-Mediated Cell Polarization ». *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 106 (7): 2194-99.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808602106>.
- Rowat, A. C., J. Lammerding, et J. H. Ipsen. 2006. « Mechanical Properties of the Cell Nucleus and the Effect of Emerin Deficiency ». *Biophysical Journal* 91 (12): 4649-64.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.086454>.
- Rubio-Cabezas, Oscar, Vishwajeet Puri, Incoronata Murano, Vladimir Saudek, Robert K. Semple, Satya Dash, Caroline S. S. Hyden, et al. 2009. « Partial Lipodystrophy and Insulin Resistant Diabetes in a Patient with a Homozygous Nonsense Mutation in CIDEC ». *EMBO Molecular Medicine* 1 (5): 280-87.
<https://doi.org/10.1002/emmm.200900037>.
- Salpingidou, Georgia, Andrei Smertenko, Irena Hausmanowa-Petrucewicz, Patrick J. Hussey, et Chris J. Hutchison. 2007. « A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane ». *The Journal of Cell Biology* 178 (6): 897-904. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702026>.
- Scaffidi, Paola, et Tom Misteli. 2006. « Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5776): 1059-63.
<https://doi.org/10.1126/science.1127168>.
- Schreiber, Katherine H., et Brian K. Kennedy. 2013. « When Lamins Go Bad: Nuclear Structure and Disease ». *Cell* 152 (6): 1365-75.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.015>.
- Schuldt, Alison. 2013. « Mechanotransduction: Lamin A for Tension Relief ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (10): 610. <https://doi.org/10.1038/nrm3670>.
- Sharp, Louis Z., Kosaku Shinoda, Haruya Ohno, David W. Scheel, Emi Tomoda, Lauren Ruiz, Houchun Hu, et al. 2012. « Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells ». *PloS One* 7 (11): e49452.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049452>.
- Shibata, Atsushi, Sandro Conrad, Julie Birraux, Verena Geuting, Olivia Barton, Amani Ismail, Andreas Kakarougkas, et al. 2011. « Factors Determining DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice in G2 Phase ». *The EMBO Journal* 30 (6): 1079-92.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.27>.
- Shimi, Takeshi, Katrin Pflieger, Shin-ichiro Kojima, Chan-Gi Pack, Irina Solovei, Anne E. Goldman, Stephen A. Adam, et al. 2008. « The A- and B-Type Nuclear Lamin Networks: Microdomains Involved in Chromatin Organization and Transcription ». *Genes & Development* 22 (24): 3409-21. <https://doi.org/10.1101/gad.1735208>.
- Simon, Dan N., et Katherine L. Wilson. 2011. « The Nucleoskeleton as a Genome-Associated Dynamic “Network of Networks” ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (11): 695-708. <https://doi.org/10.1038/nrm3207>.
- Smith, U., et B. B. Kahn. 2016. « Adipose Tissue Regulates Insulin Sensitivity: Role of Adipogenesis, de Novo Lipogenesis and Novel Lipids ». *Journal of Internal Medicine* 280 (5): 465-75. <https://doi.org/10.1111/joim.12540>.
- Solovei, Irina, Audrey S. Wang, Katharina Thanisch, Christine S. Schmidt, Stefan Krebs, Monika Zwerger, Tatiana V. Cohen, et al. 2013. « LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation ». *Cell* 152 (3): 584-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.009>.
- Sosa, Brian A., Andrea Rothballer, Ulrike Kutay, et Thomas U. Schwartz. 2012. « LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins ». *Cell* 149 (5): 1035-47.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.046>.
- Spear, Eric D., Erh-Ting Hsu, Laiyin Nie, Elisabeth P. Carpenter, Christine A. Hrycyna, et Susan Michaelis. 2018. « ZMPSTE24 Missense Mutations That Cause Progeroid

- Diseases Decrease Prelamin A Cleavage Activity and/or Protein Stability ». *Disease Models & Mechanisms* 11 (7). <https://doi.org/10.1242/dmm.033670>.
- Speckman, R. A., A. Garg, F. Du, L. Bennett, R. Veile, E. Arioglu, S. I. Taylor, M. Lovett, et A. M. Bowcock. 2000. « Mutational and Haplotype Analyses of Families with Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety) Reveal Recurrent Missense Mutations in the Globular C-Terminal Domain of Lamin A/C ». *American Journal of Human Genetics* 66 (4): 1192-98. <https://doi.org/10.1086/302836>.
- Stančáková, Alena, et Markku Laakso. 2014. « Genetics of Metabolic Syndrome ». *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 15 (4): 243-52. <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9293-9>.
- Steensel, Bas van, et Andrew S. Belmont. 2017. « Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression ». *Cell* 169 (5): 780-91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022>.
- Strelkov, Sergei V., Jens Schumacher, Peter Burkhard, Ueli Aebi, et Harald Herrmann. 2004. « Crystal Structure of the Human Lamin A Coil 2B Dimer: Implications for the Head-to-Tail Association of Nuclear Lamins ». *Journal of Molecular Biology* 343 (4): 1067-80. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.093>.
- Stubenvoll, Alexander, Megan Rice, Astrid Wietelmann, Matthew Wheeler, et Thomas Braun. 2015. « Attenuation of Wnt/ β -Catenin Activity Reverses Enhanced Generation of Cardiomyocytes and Cardiac Defects Caused by the Loss of Emerin ». *Human Molecular Genetics* 24 (3): 802-13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu498>.
- Swift, Joe, Irena L. Ivanovska, Amnon Buxboim, Takamasa Harada, P. C. Dave P. Dingal, Joel Pinter, J. David Pajeroski, et al. 2013. « Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6149): 1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>.
- Tang, Qi Qun, et M. Daniel Lane. 2012. « Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte ». *Annual Review of Biochemistry* 81: 715-36. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052110-115718>.
- Tapley, Erin C., et Daniel A. Starr. 2013. « Connecting the Nucleus to the Cytoskeleton by SUN-KASH Bridges across the Nuclear Envelope ». *Current Opinion in Cell Biology* 25 (1): 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.014>.
- Tintelen, J. Peter van, Robert M. W. Hofstra, Hilga Katerberg, Tom Rossenbacker, Ans C. P. Wiesfeld, Gideon J. du Marchie Sarvaas, Arthur A. M. Wilde, et al. 2007. « High Yield of LMNA Mutations in Patients with Dilated Cardiomyopathy and/or Conduction Disease Referred to Cardiogenetics Outpatient Clinics ». *American Heart Journal* 154 (6): 1130-39. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.07.038>.
- Toda, Noboru, et Tomio Okamura. 2013. « Obesity Impairs Vasodilatation and Blood Flow Increase Mediated by Endothelial Nitric Oxide: An Overview ». *Journal of Clinical Pharmacology* 53 (12): 1228-39. <https://doi.org/10.1002/jcph.179>.
- Todendi, Pâmela F., Elisa I. Klinger, Michele B. Ferreira, Cézane P. Reuter, Miria S. Burgos, Lia G. Possuelo, et Andréia R. M. Valim. 2015. « Association of IL-6 and CRP Gene Polymorphisms with Obesity and Metabolic Disorders in Children and Adolescents ». *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 87 (2): 915-24. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140364>.
- Torvaldson, Elin, Vitaly Kochin, et John E. Eriksson. 2015. « Phosphorylation of Lamins Determine Their Structural Properties and Signaling Functions ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 6 (3): 166-71. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1017167>.
- Tsai, Pei-Ling, Chenguang Zhao, Elizabeth Turner, et Christian Schlieker. 2016. « The Lamin B Receptor Is Essential for Cholesterol Synthesis and Perturbed by Disease-Causing Mutations ». *ELife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16011>.

- Tzanavari, T., P. Giannogonas, et Katia P. Karalis. 2010. « TNF-Alpha and Obesity ». *Current Directions in Autoimmunity* 11: 145-56. <https://doi.org/10.1159/000289203>.
- Tzur, Yonatan B., Katherine L. Wilson, et Yosef Gruenbaum. 2006. « SUN-Domain Proteins: “Velcro” That Links the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (10): 782-88. <https://doi.org/10.1038/nrm2003>.
- Uhler, Caroline, et G. V. Shivashankar. 2017. « Regulation of Genome Organization and Gene Expression by Nuclear Mechanotransduction ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (12): 717-27. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.101>.
- Vague, J. 1999. « The Degree of Masculine Differentiation of Obesities: A Factor Determining Predisposition to Diabetes, Atherosclerosis, Gout, and Uric Calculous Disease. 1956 ». *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 15 (1): 89-90; discussion 91.
- Vantyghem, M. C., D. Vincent-Desplanques, F. Defrance-Faivre, J. Capeau, C. Fermon, A. S. Valat, O. Lascols, et al. 2008. « Fertility and Obstetrical Complications in Women with LMNA-Related Familial Partial Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (6): 2223-29. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2521>.
- Vantyghem, Marie-Christine, Anne-Sophie Balavoine, Claire Douillard, Frédérique Defrance, Lucile Dieudonne, Fanny Mouton, Christine Lemaire, et al. 2012. « How to Diagnose a Lipodystrophy Syndrome ». *Annales D'endocrinologie* 73 (3): 170-89. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2012.04.010>.
- Verstraeten, Valerie L. R. M., Johan Renes, Frans C. S. Ramaekers, Miriam Kamps, Helma J. Kuijpers, Fons Verheyen, Martin Wabitsch, Peter M. Steijlen, Maurice A. M. van Steensel, et Jos L. V. Broers. 2011. « Reorganization of the Nuclear Lamina and Cytoskeleton in Adipogenesis ». *Histochemistry and Cell Biology* 135 (3): 251-61. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0792-4>.
- Vigouroux, C., M. Auclair, E. Dubosclard, M. Pouchelet, J. Capeau, J. C. Courvalin, et B. Buendia. 2001. « Nuclear Envelope Disorganization in Fibroblasts from Lipodystrophic Patients with Heterozygous R482Q/W Mutations in the Lamin A/C Gene ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 24): 4459-68.
- Vigouroux, C., J. Magré, M. C. Vantyghem, C. Bourut, O. Lascols, S. Shackleton, D. J. Lloyd, et al. 2000a. « Lamin A/C Gene: Sex-Determined Expression of Mutations in Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy and Absence of Coding Mutations in Congenital and Acquired Generalized Lipodystrophy ». *Diabetes* 49 (11): 1958-62.
- . 2000b. « Lamin A/C Gene: Sex-Determined Expression of Mutations in Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy and Absence of Coding Mutations in Congenital and Acquired Generalized Lipodystrophy ». *Diabetes* 49 (11): 1958-62.
- Vlcek, S., T. Dechat, et R. Foisner. 2001. « Nuclear Envelope and Nuclear Matrix: Interactions and Dynamics ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 58 (12-13): 1758-65. <https://doi.org/10.1007/PL00000815>.
- Vykoukal, Daynene, et Mark G. Davies. 2011. « Vascular Biology of Metabolic Syndrome ». *Journal of Vascular Surgery* 54 (3): 819-31. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.01.003>.
- Waldén, Tomas B., Ida R. Hansen, James A. Timmons, Barbara Cannon, et Jan Nedergaard. 2012. « Recruited vs. Nonrecruited Molecular Signatures of Brown, “Brite,” and White Adipose Tissues ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302 (1): E19-31. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2011>.
- Wang, Haina, Shuqian Dong, Hui Xu, Jun Qian, et Jingyun Yang. 2012. « Genetic Variants in FTO Associated with Metabolic Syndrome: A Meta- and Gene-Based Analysis ». *Molecular Biology Reports* 39 (5): 5691-98. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1377-y>.

- Wang, Mei, et Patrick J. Casey. 2016. « Protein Prenylation: Unique Fats Make Their Mark on Biology ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (2): 110-22. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.11>.
- Wang, Qiong A., Caroline Tao, Rana K. Gupta, et Philipp E. Scherer. 2013. « Tracking Adipogenesis during White Adipose Tissue Development, Expansion and Regeneration ». *Nature Medicine* 19 (10): 1338-44. <https://doi.org/10.1038/nm.3324>.
- Wang, Wenjia, Zhubing Shi, Shi Jiao, Cuicui Chen, Huizhen Wang, Guoguang Liu, Qiang Wang, Yun Zhao, Mark I. Greene, et Zhaocai Zhou. 2012. « Structural Insights into SUN-KASH Complexes across the Nuclear Envelope ». *Cell Research* 22 (10): 1440-52. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.126>.
- Watkins, Laurence O. 2004. « Epidemiology and Burden of Cardiovascular Disease ». *Clinical Cardiology* 27 (6 Suppl 3): III2-6.
- Wheeler, Matthew A., Alice Warley, Roland G. Roberts, Elisabeth Ehler, et Juliet A. Ellis. 2010. « Identification of an Emerin-Beta-Catenin Complex in the Heart Important for Intercalated Disc Architecture and Beta-Catenin Localisation ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (5): 781-96. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0219-8>.
- Wicklund, Matthew P., et John T. Kissel. 2014. « The Limb-Girdle Muscular Dystrophies ». *Neurologic Clinics* 32 (3): 729-49, ix. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.005>.
- Wilhelmsen, Kevin, Sandy H. M. Litjens, Ingrid Kuikman, Ntambua Tshimbalanga, Hans Janssen, Iman van den Bout, Karine Raymond, et Arnoud Sonnenberg. 2005. « Nesprin-3, a Novel Outer Nuclear Membrane Protein, Associates with the Cytoskeletal Linker Protein Plectin ». *The Journal of Cell Biology* 171 (5): 799-810. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506083>.
- Wilson, Katherine L., et Roland Foisner. 2010. « Lamin-Binding Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (4): a000554. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000554>.
- Worman, Howard J., et Gisèle Bonne. 2007. « “Laminopathies”: A Wide Spectrum of Human Diseases ». *Experimental Cell Research* 313 (10): 2121-33. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.028>.
- Worman, Howard J., Loren G. Fong, Antoine Muchir, et Stephen G. Young. 2009. « Laminopathies and the Long Strange Trip from Basic Cell Biology to Therapy ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1825-36. <https://doi.org/10.1172/JCI37679>.
- Wu, Jun, Pontus Boström, Lauren M. Sparks, Li Ye, Jang Hyun Choi, An-Hoa Giang, Melin Khandekar, et al. 2012. « Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human ». *Cell* 150 (2): 366-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>.
- Ye, Q., et H. J. Worman. 1994. « Primary Structure Analysis and Lamin B and DNA Binding of Human LBR, an Integral Protein of the Nuclear Envelope Inner Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (15): 11306-11.
- Yu, Juehua, Kai Lei, Min Zhou, Cheryl M. Craft, Gezhi Xu, Tian Xu, Yuan Zhuang, Ren Xu, et Min Han. 2011. « KASH Protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN Proteins SUN1/2 Mediate Nuclear Migration during Mammalian Retinal Development ». *Human Molecular Genetics* 20 (6): 1061-73. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq549>.
- Zhang, Qiuping, Cornelia Bethmann, Nathalie F. Worth, John D. Davies, Christina Wasner, Anja Feuer, Cassandra D. Ragnauth, et al. 2007. « Nesprin-1 and -2 Are Involved in the Pathogenesis of Emery Dreifuss Muscular Dystrophy and Are Critical for Nuclear Envelope Integrity ». *Human Molecular Genetics* 16 (23): 2816-33. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm238>.

- Zhang, Xiaochang, Kai Lei, Xiaobing Yuan, Xiaohui Wu, Yuan Zhuang, Tian Xu, Renner Xu, et Min Han. 2009. « SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice ». *Neuron* 64 (2): 173-87. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.018>.
- Zhang, Y., M. Castori, G. Ferranti, M. Paradisi, et B. P. Wordsworth. 2009. « Novel and Recurrent Germline LEMD3 Mutations Causing Buschke-Ollendorff Syndrome and Osteopoikilosis but Not Isolated Melorheostosis ». *Clinical Genetics* 75 (6): 556-61. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01177.x>.

Abstract :

Les laminopathies sont un ensemble de pathologies causée par des mutations du gène *LMNA* codant pour la lamine A, une protéine nucléaire impliquée dans le maintien de la structure et de l'intégrité du noyau. A ce jour, plus de 200 variants pathogènes ont été impliqués dans diverses laminopathies allant de formes multi-systémique induisant un vieillissement accéléré à des formes spécifiques tissulaires moins sévères touchant soit le tissu adipeux, soit le tissu musculaire, soit les nerfs périphériques. Le syndrome de Dunnigan ou lipodystrophie familiale partielle de type 2 est la forme classique de laminopathies spécifique du tissu adipeux. D'autres mutations du gène *LMNA* ont été associées à des formes modérées de lipodystrophies dont notamment le syndrome métabolique. En 2011, une étude sur une cohorte de 87 patients atteints de syndrome métabolique a exposé chez 10 patients un nombre important d'anomalies nucléaires. Des analyses génétiques ont mis en évidence des mutations dans les gènes *LMNA* et *ZMPSTE24* chez 3 patients.

Nous présentons ici les résultats de 8 patients présentant un taux anormal d'anomalies nucléaires et un syndrome métabolique. Une première approche a consisté à étudier *in vitro* les patients présentant une mutation du gène *LMNA* ou *ZMPSTE24*. Afin de déterminer l'effet de ces mutations, nous avons établi, sur des fibroblastes, un panel d'expériences visant à tester la prolifération cellulaire, la réplication cellulaire ainsi que la sénescence des cellules. Nous avons également établi une approche par transfection visant soit à reproduire les anomalies nucléaires en exprimant une lamine A mutée dans des fibroblastes contrôle, soit en inhibant la production de lamine A par stratégie d'ARN interférence pour corriger le phénotype nucléaire. Les résultats montrent que les mutations, *in vitro*, ont un impact sur l'apparition des anomalies nucléaires associée à une sénescence accélérée. Cette approche a également visé les patients ne portant pas de mutation dans les gènes *ZMPSTE24* et *LMNA*. Ainsi, nous observons, *in vitro* chez ses patients un impact sur la réplication et la prolifération cellulaire caractérisant une sénescence accélérée. L'inhibition par ARN interférence de la lamine A montre une diminution des anomalies nucléaires soulignant un effet indirect sur cette protéine. Une approche par séquençage haut-débit a permis d'identifier des mutations dans des gènes partenaires de la lamines expliquant la présence importante d'anomalies nucléaires chez les patients.

Le syndrome métabolique présente des caractéristiques communes aux lipodystrophies d'origine génétique. Malgré la prévalence élevée du syndrome métabolique dans le monde, le nombre de mutations décrit reste faible et la proportion de ces mutations est sous-estimée. L'étude de ces formes intermédiaires présentant des caractéristiques communes avec les laminopathies pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients et de mieux comprendre l'impact des mutations identifiées.

Mots-clés : *LMNA*, *ZMPSTE24*, laminopathies, syndrome métabolique, tissu adipeux.