

Thèse de Doctorat

Nejma BELAADI

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : l'insitut du thorax, INSERM UMR 1087/CNRS UMR 6291, Université de Nantes

Soutenue le lundi 20 novembre 2017

Régulation de la mitose par la rigidité de la matrice extracellulaire : étude du rôle de la protéine SUN2

JURY

Président du jury

Rapporteurs : **Catherine COIRAULT**, Directrice de recherche INSERM, Institut de Myologie INSERM UMRS 974-UPMC Université Paris 6 - G.H. Pitié-Salpêtrière - Paris

Arnaud ECHARD, Directeur de recherche CNRS, Institut Pasteur - Paris

Examineur : **René-Marc MÈGE**, Directeur de recherche CNRS, Institut Jacques Monod - Paris

Directeur de Thèse : **Gervaise LOIRAND**, Directrice de recherche INSERM, l'institut du thorax INSERM UMR 1087/CNRS UMR 6291 - Nantes

Co-encadrant de Thèse : **Christophe GUILLUY**, Chargé de recherche INSERM, Institute for Advanced Biosciences - Centre de Recherche UGA/INSERM UMR 1209/CNRS UMR 5309 - Grenoble

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'échanges scientifiques et humains avec de nombreuses personnes que j'aimerais remercier.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes rapporteurs, Madame Catherine Coirault et Monsieur Arnaud Echard pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse et pour le temps consacré à lire ce manuscrit, ainsi que Monsieur René-Marc Mège pour avoir accepté d'être examinateur lors de ma soutenance. Je remercie également Messieurs Edgar Gomes et Xavier Prieur pour leur participation à mes comités de suivi de thèse lors desquels nos échanges intéressants ont contribué à l'avancement de ce projet.

Merci aux directeurs successifs Hervé Le Marec et Richard Redon de m'avoir permis d'effectuer ma thèse à l'institut du thorax et à Pierre Hainaut de m'avoir permis de travailler dans son laboratoire, l'Institute for Advanced Biosciences à Grenoble.

Je remercie ensuite chaleureusement ma directrice de thèse Gervaise Loirand. Gervaise, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe. Dès le master 2, travailler avec vous a été pour moi très formateur. Votre rigueur scientifique et vos conseils avisés et constructifs m'ont permis de développer mes compétences scientifiques pendant ces trois années. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ce travail ainsi que pour nos échanges toujours très agréables tant sur le plan humain que scientifique.

Je tiens à exprimer mon immense gratitude à Christophe Guilluy, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Christophe, ce fût un privilège de travailler avec un chercheur aussi passionné et créatif que toi. Ta capacité à raisonner à la vitesse de l'éclair, parfois intimidante, et ton énorme culture scientifique resteront des modèles pour moi, merci pour tout le savoir que tu m'as transmis sur la mécanotransduction (et pas que !). Tout au long de ce travail, tu m'as donné la liberté d'action qui m'a fait gagner en autonomie et tu m'as toujours encouragée à exprimer et à aller au bout de mes idées. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et ta confiance. Je tiens également à te remercier pour ta sollicitude à l'égard de ton équipe, tu es toujours aux petits soins, de sorte qu'il est très agréable de travailler à tes côtés. Merci également de m'avoir offert l'opportunité de participer à de super congrès états-uniens et de m'avoir fait découvrir un autre laboratoire, l'Institute for Advanced Biosciences à Grenoble. Même si cet éloignement a parfois été difficile au départ, mes séjours à Grenoble furent une expérience très enrichissante tant au niveau professionnel que personnel. J'ai ainsi pu rencontrer et échanger avec les très sympathiques scientifiques grenoblois, mais également m'initier à la randonnée sur des sommets au noms enchanteurs, tels que

« l'Emeindras du dessus » et faire la connaissance d'animaux exotiques comme Marmotti et Marmotton (tu leur donneras un Granola de ma part). Merci enfin pour ton humour ? (☺). J'espère en tous cas que tu as autant apprécié notre collaboration scientifique que moi. Passe le bonjour à Laurianne et à Michou de ma part !

Un chaleureux merci ensuite à tous les membres de l'équipe III de l'institut du thorax :

Nath Nath, merci d'avoir cultivé sans relâche, toujours avec enthousiasme, pour me fournir ces superbes cellules ! Ta présence et ton sourire au quotidien furent pour moi d'un grand réconfort et comme d'avoir le soleil du Sud au labo. Merci pour ton aide, ton soutien et ta bienveillance ainsi que d'avoir été ma partenaire de chant. Je te souhaite plus que tout d'être heureuse.

Sieur Rio, votre présence a été la bouffée de protoxyde d'azote de ma thèse, bien que vous ayez plusieurs fois essayé de « m'assassiner » ... merci d'avoir apporté le grain de folie indispensable à la bonne ambiance de l'équipe. Merci également pour mon initiation aux techniques de biomol, ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

Sandrine HEURtebise, merci pour ta gentillesse et ton aide au quotidien ainsi que pour tout ce que l'on a partagé comme voisines de bureau.

Merci à Vincent, qui m'a donné l'opportunité de rejoindre l'équipe en master (et il a eu raison !), mais qui par la suite a rapidement été jaloux de ma réussite et à plusieurs fois essayé de m'évincer ☺ (on aura bien ri !).

Florian je te souhaite une bonne fin de thèse sans trop de tRac et de la réussite dans tes projets futurs.

Morgane, merci d'avoir apporté la touche Rock'n Roll/Metal qui manquait à la salle de culture et pour ta bonne humeur au quotidien.

Céline, j'ai vraiment apprécié échanger avec toi, merci pour ton soutien et tes conseils toujours francs et pertinents (oui oui j'ai commencé à rédiger ☺) et pour la petite initiation à l'expérimentation animale.

Chrystelle, ce fut un plaisir pour moi de t'avoir comme prof à la fac puis comme prof de danse au labo !

Angela, merci pour les excellentes recettes italiennes et pour m'avoir fait voyager avec ton accent chantant.

Je remercie également « les poumons » de l'équipe : Laure, Greg, Martin, Marie-Aude, Aurore et Marie La Belge venue passer quelque temps au labo. Et également les membres de l'ex-équipe 6 Carole, Eugénie, Jennifer et Luc pour les escape games/restos/soirées.

Merci également aux stagiaires qui ont travaillé avec moi, Marion Burban et Benjamin Le Vely, ainsi qu'aux médecins successifs de l'équipe avec qui il était toujours passionnant d'échanger et particulièrement notre Dr Mamour, Alexis Moles, voisin de bureau génial qui m'a appris tous les secrets du polygone de Willis.

Merci à tous les thésards de l'institut du thorax et en particulier à mes copines de promo :

Nadjet, on a tellement partagé depuis le master et tellement papoté ! Merci d'avoir été là quand ça allait bien et moins bien. Ta détermination et ta force de caractère ont été des piliers et des exemples pour moi pour ne jamais rien lâcher. Toutes nos conversations sur la science, la vie, les fringues^^ vont me manquer. Laure, ton petit accent du Sud a été le rayon de soleil de cette fin de thèse. Merci mon chaton pour ta bonne humeur communicative et pour tout ce que l'on a partagé comme co-thésardes et amies. Marine, on aura galéré jusqu'au bout mais on y est arrivées ! Et aussi un big up tout particulier aux chipmunks Martin et Damien, qui incarnent la fraîcheur et le renouveau de l'institut par leur dynamisme et leur bogossitude. Merci pour leur soutien et leur « positive attitude » ainsi que pour avoir été mes coachs sportifs (il faudrait que j'y retourne d'ailleurs...). À quand la prochaine soirée avec un petit Trucker's Hitch ? Merci également à toute l'équipe de l'asso DNA BioSanté.

Un grand MERCI aux Grenoblois pour m'avoir si bien accueillie au cœur des montagnes :

Julien, c'était vraiment super de t'avoir comme co-thésard, toujours à 100 à l'heure, ton dynamisme, ton assurance et ta boulimie de biblio ont été une source d'inspiration pour moi. Merci pour avoir passé tout ce temps devant le spinning disk et pour tous ces moments devenus mythiques où on aura bien ri : ta façon élégante de tomber d'un tabouret, la chaussette à la douane US, la recherche désespérée de ton japonais à l'ASCB, le fameux anti-DNase I, sans oublier les expressions cultes « à demain à l'heure des indiens » et « à demain à l'heure du bon pain » qui vont me manquer. Merci également pour les dimanches crêpes bien sympathiques, spéciale dédicace à l'adorable Madame Aureille pour sa gentillesse. Gambatte pour la suite fillot, je n'ai aucun doute sur la réussite de ta thèse ! Et soyez heureux avec Bertille (je prépare le barbecue pour cet été ;-))

Lydia, tu es LA superbe rencontre de cette thèse. Merci d'abord pour ton travail toujours impeccable, tu es pour moi un modèle d'organisation et de rigueur. Mais avant tout tu m'as d'emblée chaleureusement accueillie, je me suis tout de suite sentie intégrée à l'équipe grenobloise grâce à toi. J'ai ensuite découvert une personne géniale qui a su m'apporter son aide, me donner des conseils, me reconforter et être à l'écoute. Merci pour ces super soirées, pour les balades dans Grenoble, pour m'avoir fait découvrir les meilleurs fromages du monde, tu es pour moi bien plus qu'une collègue. Une seule déception, je n'ai pas pu voir les Brûleurs de Loups ! Il faut qu'on planifie ça quand je reviendrai ;-). Et passe le bonjour à Tanguy et Malo bien sûr !

À toute l'équipe Guilluy : Sandrine, pour ta gentillesse et pour m'avoir donné un aperçu plutôt cool du monde des embryons de poulets ; Angélique, je te souhaite plein de bonheur et de réussite pour la suite ; Monika, maybe we will have the opportunity to work together in the future !

Merci également à Laurence Lafanechère pour nos discussions intéressantes sur les microtubules ainsi que pour ses conseils et merci à son équipe : Lauralie,

Sacnicte, Karine, Sophie, Anne-Sophie pour nos échanges scientifiques et gastronomiques ! Et un merci particulier à Clotilde pour ton aide précieuse au labo (il est où le ladder ? il est où le milieu ? au secours Lydia n'est pas làààààà ☺) et pour ta bonne humeur, c'était cool de partager ces bons moments autour des paillasses (les plaquettes c'est vraiment trop fun !) et autour d'un verre. Je vous souhaite plein de bonheur et de voyages avec Clément.

Je remercie également Corinne Albiges-Rizo pour ses conseils, les thésards et post-docs grenoblois Sacho, Adèle, Kate et Lauralie pour leur aide au labo et leur accueil sympathique et Micha pour son sourire et sa malice. Merci également à Elisa la biophysicienne du LiPhy. Elisa, thank you for the great scientific discussions that we had and for sharing your knowledge and your advices on mitosis.

Merci à tous les membres de l'institut du thorax, grâce à qui l'ambiance de travail au labo est très agréable et particulièrement :

Gilliane Chadeuf, le sage du laboratoire et la classe incarnée ! Merci pour ton aide et tes précieux conseils au quotidien, tu es pour moi LA référence en termes d'organisation, d'efficacité et de rigueur scientifique. Merci ton soutien et tes encouragements et également pour nos discussions très enrichissantes pour moi sur le plan humain ainsi que pour l'initiation au tango super sympa ! Xavier Prieur, notre rossignol Nantais, pour ta bonne humeur contagieuse et réconfortante et pour tes impressionnants talents d'acteur (à moins que ce ne soit vraiment de la folie ?) qui font de toi un véritable artiste-enseignant-chercheur. Benjamin Lauzier, malgré des débuts difficiles, nous avons finalement trouvé un terrain d'entente plutôt sympa, comme tu m'as si bien dit un jour « chien qui aboie ne mord pas » ;-). Merci pour ta franchise, ta gentillesse (je sais qu'un cœur tendre se cache sous cette carapace de 2 m), pour tes conseils et pour les soirées jeu. Tu passeras le bonjour à Sandie et le miaou à Papuche. Karim Si-Tayeb, merci de m'avoir donné la chance de mener mon premier projet de recherche en autonomie en master et de m'avoir transmis ta passion pour ce métier. Christian Dina, ka pai pour nos discussions ethno/sociologiques toujours très intéressantes et très drôles. Florian Atger, malgré ton arrivée récente, tu as déjà eu le temps de mettre sens dessus dessous le premier étage et plus particulièrement mon bureau ! Merci pour ton humour, ta coolitude et tes conseils. Je te souhaite plein de bonheur et de bonnes nuits de sommeil avec ton bout de chou ☺. Vimla Mayoura, pour ton soutien et pour m'avoir encadrée dans la gestion des stages par comparaison. Merci pour ta gentillesse et ta patience quand il s'agissait de m'expliquer les rouages de la partie clinique de l'institut (« attends, ce service c'est l'institut ou c'est pas l'institut ? et donc là c'est qui le cadre et c'est qui le chef de service ? »). Ce fut un plaisir de travailler avec toi. Merci à Isabelle Rivaud et Françoise Le Bouffant pour leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie également l'équipe très sympathique du secrétariat de l'institut et en particulier Aurélie pour son travail toujours nickel et pour sa capacité à gérer les situations de dernière minute, ainsi que ses homologues gestionnaires grenobloises Charlotte et Aude.

Merci aux « anciens », pour leur aide et leurs précieux conseils, Julie et Faouzi, Gwe gwe, Gigia, Sophie (alias Madame Burelou), Lucile, Paupau, Thibault comme un camion (j'ai apprécié être une cysmyk girl) et Valentine. Merci à Davy Halary et Nathalie Cressan pour leur gentillesse et leur disponibilité (merci Davy d'avoir souvent remanié les horaires du magasin pour moi !).

Merci aux enseignants de la faculté des Sciences et Techniques de Nantes qui m'ont donné l'envie de continuer dans cette voie et particulièrement Agnès Aubry pour avoir cru en moi et pour m'avoir donné ma chance au départ.

Merci également au personnel des plateformes de microscopie MicroPICell à Nantes et MicroCell à Grenoble ainsi qu'à Guy Louarn et Luan Nguyen pour leur aide précieuse sur l'AFM de l'Institut des Matériaux Jean Rouxel.

Merci à mes amis pour leur soutien indéfectible : mes sœurs de toujours Alice et France ; Anaïs, Violaine et Marine, nos retrouvailles annuelles ont à chaque fois été une vraie bouffée d'oxygène pour moi ; Riz et Bapt, je vous souhaite plein de bonheur.

Merci à ma famille et surtout à mes parents, pour m'avoir écoutée, (supportée !), et pour m'avoir toujours encouragée et soutenue dans mes choix. Merci avant tout pour tout ce que vous avez fait et faites pour moi au quotidien, pour votre amour et votre soutien sans faille. J'ai vraiment de la chance de vous avoir, vous êtes les meilleurs parents du monde !

Enfin un gigantesque MERCI à Maxim. Il m'est difficile de trouver les mots pour exprimer mes sentiments. Merci avant tout pour ton soutien inconditionnel et pour m'avoir toujours boostée et redonné confiance en moi, pour avoir su trouver les bons mots dans les moments difficiles. Merci pour tout ce que l'on a partagé...

AVANT-PROPOS

La cellule est l'unité biologique fondamentale de tous les êtres vivants. Le corps humain en compte en moyenne dix mille milliards organisées en tissus, constituant eux-mêmes les différents organes (Sender et al., 2016). Pour former un tissu les cellules se structurent au sein d'un réseau complexe de macromolécules appelé la matrice extracellulaire (MEC). La MEC est sécrétée par les cellules et en retour, exerce une régulation sur le phénotype cellulaire. Alors que les premiers travaux fondateurs sur le cytosquelette, envisageaient que les propriétés mécaniques de la MEC puissent affecter le comportement cellulaire (Bissell et al., 1982; Burridge, 1981), jusqu'à la fin des années 80, la plupart des recherches se sont focalisées sur l'aspect biochimique de cette régulation. L'interaction cellule/MEC permet en effet l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, contrôlant par exemple la prolifération ou la survie cellulaire (Meredith et al., 1993). Or, il est aujourd'hui clairement établi qu'en plus de cette régulation biochimique, les propriétés mécaniques de la MEC influencent de façon importante le phénotype et les fonctions cellulaires. La MEC possède en effet une rigidité propre qui affecte notamment l'organisation du cytosquelette, la différenciation cellulaire ou la migration cellulaire (Pelham and Wang, 1997). À l'échelle de l'organisme, un accroissement de la rigidité de la MEC apparaît de façon physiologique lors du vieillissement et caractérise également de nombreuses maladies dont l'hypertension ou le cancer (Bonnans et al., 2014). Cependant, les mécanismes moléculaires régulant la réponse cellulaire aux modifications de la rigidité de la MEC sont encore peu connus.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée à la division cellulaire et plus particulièrement à la régulation de la mitose par l'environnement mécanique. Mon objectif a été de déterminer l'effet de la rigidité de la MEC sur la progression mitotique et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation. L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisé dans l'équipe et sous la direction du Dr Gervaise Loirand au sein de l'unité de recherche de l'institut du thorax (Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291) à Nantes ainsi que dans l'équipe du Dr Christophe Guilluy à l'Institute for Advanced Biosciences (Centre de Recherche UGA/Inserm U 1209/CNRS UMR 5309) à Grenoble.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
AVANT-PROPOS	VI
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS	1
LISTE DES FIGURES	2
LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
I. Les cellules et la rigidité de leur microenvironnement	9
1. La matrice extracellulaire (MEC)	9
1.1 La composition de la MEC	9
1.2 Les modifications et la dégradation de la MEC	11
1.3 Les fonctions de la MEC	12
1.4 Les propriétés mécaniques de la MEC : la rigidité	13
2. Les conséquences de la rigidité de la MEC sur le comportement cellulaire	16
2.1 La mécano-sensibilité de la rigidité	17
2.1.1 Les adhérences focales	17
2.1.2 Le cytosquelette d'actine	20
2.1.3 Le remodelage des adhérences et du cytosquelette d'actine en réponse à la rigidité de la MEC	23
2.2 Les modifications des fonctions cellulaires en réponse à la rigidité de la MEC	27
2.2.1 La migration	27
2.2.2 La prolifération et la survie cellulaire	29
2.2.3 La différenciation	31
3. Exemple de la physiopathologie de la MEC de la paroi vasculaire	33
3.1 La structure des vaisseaux	33
3.2 Le remodelage artériel lié au vieillissement	34
II. La mitose : réorganisation mécanique de la cellule	40
1. La progression mitotique	40
1.1 Les phases de la mitose	40
1.2 Le fuseau mitotique	43
1.3 Le point de contrôle du fuseau mitotique	45
1.4 Les mécanismes de régulation du positionnement du fuseau mitotique	47
2. La régulation du cytosquelette d'actine au cours de la mitose et son influence sur le fuseau mitotique	49
2.1 Le cortex d'actine et l'arrondissement de la cellule au cours de la prophase	49
2.1.1 La formation du cortex d'actine	50

2.1.2	<i>Le cortex d'actine et la résistance au confinement</i>	52
2.1.3	<i>L'interaction cortex/fuseau</i>	54
2.1.4	<i>L'organisation de l'actine et la tension corticale affectent le positionnement du fuseau mitotique</i>	57
2.2	La stabilisation du fuseau mitotique par les fibres de rétraction et les adhérences	59
2.3	Le remodelage du cortex en anaphase	65
III.	La protéine SUN2	70
1.	Sa structure	70
1.1	À travers les espèces	70
1.2	Structure protéique	71
1.3	SUN2 au cœur du complexe LINC	74
2.	Ses rôles	77
2.1	La détermination de la structure de l'enveloppe nucléaire	78
2.2	La dynamique du cytosquelette	79
2.3	L'ancrage et les mouvements du noyau au cours de la migration	79
2.4	La transmission des forces	83
2.5	La régulation des dommages à l'ADN	86
2.6	La division cellulaire	87
2.7	Implication dans les maladies	92
	OBJECTIFS DE THÈSE	95
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	96
I.	Outils cellulaires	96
1.	Cultures cellulaires	96
1.1	Cellules HeLa	96
1.2	Cellules A7r5	97
1.3	Mouse Embryonic Fibroblasts	97
2.	Matrices de différentes rigidités	97
3.	Synchronisation des cellules en mitose	98
4.	Extinction de l'expression protéique	98
4.1	siRNAs	98
4.2	Transfection des siRNAs	99
5.	Évaluation de la stabilité de SUN2	99
II.	Analyse de l'expression protéique par western blot	100
1.	Préparation des échantillons protéiques	100
2.	Migration et transfert	100
3.	Immunomarquage et détection	100
III.	Analyse de l'expression de l'ARN messager de SUN2	102
1.	Extraction de l'ARN	102

2. Transcription inverse	102
3. PCR quantitative	103
IV. Immunofluorescence indirecte sur cellules fixées	104
1. Protocole expérimental	104
2. Analyses	106
2.1 L'expression de SUN2	106
2.2 L'actine corticale	107
2.3 Les adhérences	107
V. Vidéomicroscopie	107
1. Microscopie à contraste de phase	108
2. Microscopie confocale spinning disk	108
2.1 Réglages utilisés	108
2.2 Analyse de la longueur du fuseau mitotique et du diamètre cellulaire	109
VI. Microscopie à force atomique	110
VII. Tests statistiques	113
RÉSULTATS	114
ARTICLE n°1 SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity	114
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	138
➤ La rigidité de la MEC favorise la progression mitotique et stabilise SUN2	138
La rigidité de la MEC régule la progression mitotique	138
L'expression et la stabilité de SUN2 augmentent avec la rigidité de la MEC	139
➤ SUN2 favorise la progression mitotique en régulant la formation du cortex d'actine	141
L'allongement du fuseau mitotique retarde l'arrivée en anaphase	142
La déplétion de SUN2 induit des défauts du cortex d'actine	143
SUN2 favorise la formation du cortex d'actine en activant FHOD1	144
➤ SUN2 peut-elle réguler la progression mitotique par d'autres mécanismes ?	146
SUN2 comme régulatrice directe de la longueur du fuseau mitotique	146
Implication dans l'expression génique	147
CONCLUSION	150
ANNEXES	153
ARTICLE n°2	153
REVUE n°1	164
REVUE n°2	176
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	186

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

➤ Revues

Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus.

Belaadi N, Aureille J, Guilluy C

Publiée dans Cells, 2016

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

Aureille J, **Belaadi N**, Guilluy C

Publiée dans Current Opinion in Cell Biology, 2017

➤ Articles

Analyzing mechanotransduction through the LINC complex in isolated nuclei.

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

En révision dans Methods in Molecular Biology, 2017

SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity.

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

Lettre soumise dans Nature Cell Biology

➤ Communication orale

SUN2 accumulation contributes to vascular smooth muscle cell alterations induced by matrix rigidity.

Experimental Biology, Boston, 28 mars – 1 avril 2015

➤ Posters

SUN2 regulates vascular smooth muscle cell proliferation in response to extracellular matrix stiffening.

Belaadi N, Chadeuf G, Loirand G and Guilluy C

Printemps de la cardiologie, Strasbourg, 24 – 25 avril 2014

Obtention du prix du meilleur poster

SUN2 accumulation contributes to vascular smooth muscle cell alterations induced by matrix rigidity.

Belaadi N, Chadeuf G, Nguyen L, Rio M, Louarn G, Loirand G and Guilluy C

Experimental Biology, Boston, 28 mars – 1 avril 2015

SUN2 accumulation contributes to vascular smooth muscle cell alterations induced by matrix rigidity.

Belaadi N, Chadeuf G, Nguyen L, Rio M, Louarn G, Loirand G and Guilluy C

American Society for Cell Biology Meeting, San Diego, 12 – 16 décembre 2015

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'organisation de la MEC est très variable selon le type tissulaire	10
Figure 2 : Représentation schématique du diagramme contrainte/déformation.....	14
Figure 3 : Échelle représentant l'étendue des rigidités ou modules élastiques (en Pascals) des différents tissus et organes de l'organisme humain	15
Figure 4 : Illustration du processus de mécanotransduction	17
Figure 5 : Schéma d'une adhérence focale.....	19
Figure 6 : Les filaments d'actine branchés et non branchés	21
Figure 7 : Schéma de l'organisation des filaments d'actine en différentes structures	22
Figure 8 : La GTPase RhoA régule la formation et la contraction des fibres de stress	23
Figure 9 : Les adhérences répondent à la rigidité de la MEC	24
Figure 10 : L'organisation du cytosquelette d'actine change drastiquement en fonction de la rigidité de la MEC	26
Figure 11 : La durotaxie	28
Figure 12 : La rigidité contrôle la localisation de YAP/TAZ et son activation	30
Figure 13 : La différenciation cellulaire est dirigée par la rigidité de la MEC.....	32
Figure 14 : Schéma de la structure d'une artère de moyen calibre avec ses trois tuniques.....	33
Figure 15 : Schéma des modifications de la paroi artérielle au cours du vieillissement	37
Figure 16 : Les phases du cycle cellulaire	40
Figure 17 : Description des phases de la mitose par Walther Flemming	41

Figure 18 : Les microtubules du fuseau mitotique.....	44
Figure 19 : Le mode de fonctionnement du point de contrôle du fuseau mitotique...	46
Figure 20 : La dynamique de l'actine au cours de la mitose	49
Figure 21 : La formation du cortex d'actine lors du rounding	51
Figure 22 : L'ancrage du fuseau mitotique au cortex par la dynéine et le complexe G α i/LGN/NuMA	55
Figure 23 : La régulation du positionnement du fuseau mitotique par la dynéine	56
Figure 24 : La rigidité corticale est nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique	58
Figure 25 : La morphologie cellulaire et le motif des adhérences en interphase conditionnent la division cellulaire	60
Figure 26 : Le fuseau mitotique suit dynamiquement la distribution des fibres de rétraction	61
Figure 27 : Le fuseau mitotique se réoriente dans la direction des forces exercées sur la cellule	62
Figure 28 : Modèle d'orientation du fuseau mitotique <i>via</i> l'ancrage direct des intégrines à la MEC.....	64
Figure 29 : Modèle d'orientation du fuseau mitotique <i>via</i> l'activation des intégrines dépendante des forces.....	64
Figure 30 : L'initiation de la formation de l'anneau contractile en anaphase.....	67
Figure 31 : La structure des protéines SUN chez l'Homme	72
Figure 32 : La structure tridimensionnelle du domaine SUN de la protéine SUN2 ...	73
Figure 33 : La diversité d'organisation du complexe LINC	75
Figure 34 : L'interaction SUN/KASH	77
Figure 35 : Le complexe LINC contribue au maintien de l'espace périnucléaire	78
Figure 36 : Les TAN lines	81

Figure 37 : L'actin cap périnucléaire	82
Figure 38 : Le parcours d'un stimulus mécanique au sein de la cellule	84
Figure 39 : La dynamique de l'enveloppe nucléaire au cours du cycle cellulaire.....	90
Figure 40 : Définition du diamètre cellulaire et de la longueur du fuseau mitotique dans une cellule en métaphase	110
Figure 41 : Microscope à force atomique	111
Figure 42 : Mesure des forces exercées par une cellule en prométaphase par l'AFM	112
Figure 43 : Courbe des forces exercées par la cellule en prométaphase	112
Figure 44 : SUN2 régule la durée de la mitose en réponse à la rigidité de la MEC	152

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Les cinq phases de la mitose suivies de la cytokinèse, « division cytoplasmique » permettant la séparation finale des deux cellules filles.	42
TABLEAU II : Les protéines à domaine SUN sont conservées au cours de l'évolution	71
TABLEAU III : Anticorps utilisés pour l'analyse de l'expression protéique par western blot	101
TABLEAU IV : Anticorps utilisés pour les marquages par immunofluorescence	106

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFM	Atomic force microscope
APC	Adenomatous polyposis coli
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Arp2/3	Actin-related protein-2/3
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
Cas	Crk-associated substrate
Cdc20	Cell division cycle 20
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1
CMC	Cortical mechanosensory complex
CML	Cellule musculaire lisse
ConA	Concanavaline A
CPC	Chromosomal passenger complex
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
Ct	Threshold cycle
CTCF	Corrected Total Cell Fluorescence
CTNF	Corrected Total Nuclear Fluorescence
Dia	Diaphanous
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EB1	End-binding 1
Ect2	Epithelial cell transforming 2
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ERM	Ezrine, Radixine, Moésine
FAK	Focal adhesion kinase
FHOD1	Formin homology 2 domain containing 1

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GEF-H1	Guanine nucleotide exchange factor H1
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Enzyme hydrolysant le GTP
KASH	Klarsicht, ANC-1 et Syne Homology
LAP	Lamina-associated polypeptide
LGN	Leucine-Glycine-Asparagine repeat
LIMK1	LIM domain kinase 1
LINC	Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton
LOX	Lysyl-oxidase
LRMP	Lymphoid restricted membrane protein
Mad2	Mitotic arrest deficient 2
MCC	Mitotic checkpoint complex
MEC	Matrice extracellulaire
MgcRacGAP	Male germ cell Rac GTPase activating protein
MISP	Mitotic spindle positioning protein
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MMP	Matrix metalloproteinase
Nesprine	Nuclear envelope spectrin repeat protein
Nesprine-2 Giant	Nesprine-2G
NudE/EL	Nuclear distribution protein NudE homologue 1/nuclear distribution protein NudE-like 1
NuMA	Nuclear mitotic apparatus
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Plk1	Polo-like kinase 1
qPCR	PCR quantitative
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ran	Ras-related nuclear
Rho	Ras homolog

RNAi	ARN interférent
RNAse	Ribonucléase
ROCK	Rho-associated protein kinase
RQ	Relative quantification
SAC	Spindle assembly checkpoint
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Standard error of the mean
siRNA	Small interfering RNA
SLIK	Sterile-20 kinase
SLK	Ste20-like kinase
SPAG4	Sperm associated antigen 4
SPAG4-L	Sperm associated antigen 4-like
STC	S-trityl-L-cysteine
SUN	Sad1/UNC-84
SUN2	Sad1/UNC-84 domain-containing protein 2
SVF	Sérum de veau fœtal
TAN lines	Transmembrane actin-associated nuclear lines
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TBS	Tris-buffered saline
TEAD	Facteur de transcription à TEA domain
+TIPs	Plus-end-tracking proteins
YAP	Yes-associated protein

INTRODUCTION

I. Les cellules et la rigidité de leur microenvironnement

1. La matrice extracellulaire (MEC)

1.1 La composition de la MEC

Il existe deux types principaux de MEC, on distingue la matrice interstitielle du tissu conjonctif qui entoure et structure les cellules entre elles et les MEC spécialisées comme la lame basale qui sert de support et d'ancrage aux cellules épithéliales et endothéliales et les sépare du tissu conjonctif sous-jacent ou environnant. La MEC est sécrétée par les cellules qu'elle entoure comme les fibroblastes, cellules présentes de façon abondante dans le tissu conjonctif, ou les cellules épithéliales qui reposent sur la lame basale (Bonnans et al., 2014; Frantz et al., 2010).

La composition, l'abondance et l'architecture de la MEC varient en fonction des différents tissus dans l'organisme et sont adaptées à la fonction tissulaire. Par exemple, la MEC est majoritairement constituée de couches de fibres élastiques dans un gros vaisseau comme l'aorte dont le rôle est de transmettre et de conduire le flux sanguin, alors qu'elle est constituée de fibres de collagène concentriques et de minéraux dans les os qui supportent les différentes structures corporelles ([Figure 1](#)).

Malgré cette diversité, les principaux constituants de la MEC sont de l'eau, des glycosaminoglycanes seuls ou ramifiés autour d'un cœur protéique (protéoglycanes) et des protéines fibreuses (Frantz et al., 2010; Hynes and Naba, 2012; Naba et al., 2012).

Les glycosaminoglycanes, comme l'acide hyaluronique ou le chondroïtine sulfate, présents dans le cartilage sont de longues chaînes non ramifiées composées de la répétition d'un même motif dissaccharidique. Les protéoglycanes, dont la décorine, sont faits d'un cœur protéique spécifique et sont liés de façon covalente aux chaînes de glycosaminoglycanes. Tous ces polysaccharides très hydrophiles occupent la majeure partie de l'espace extracellulaire en formant un gel hydraté autour

des cellules permettant la résistance aux forces mécaniques, telles que la compression et l'étirement, dont les variations peuvent être importantes dans certains tissus comme les vaisseaux sanguins ou les cartilages (Mouw et al., 2014).

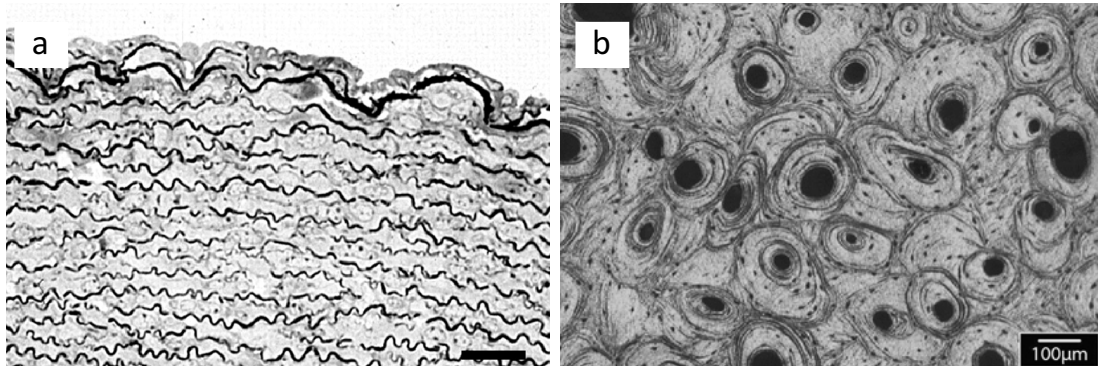


FIGURE 1 : L'ORGANISATION DE LA MEC EST TRÈS VARIABLE SELON LE TYPE TISSULAIRE

a. Coupe d'aorte humaine en microscopie électronique. Les lamelles d'élastine en noir séparent les différentes couches de cellules musculaires lisses. La lumière du vaisseau se trouve en haut de l'image. Barre d'échelle = 20 μm (Wagenseil and Mecham, 2009) b. Coupe transversale d'os compact humain en microscopie optique. Les ostéones ou systèmes de Havers (unités circulaires) sont faits de lamelles osseuses cylindriques (en gris) composées notamment de collagène et de cristaux. Entre elles se trouvent les ostéocytes (petits points noirs). Les canaux de Havers (grandes zones circulaires noires) au centre de l'ostéone laissent passer les vaisseaux sanguins et les fibres nerveuses (Shahar and Dean, 2013).

Parmi les protéines fibreuses composant la MEC, on distingue des glycoprotéines non collagéniques comme la fibronectine ou la laminine et de larges glycoprotéines ayant principalement un rôle structural comme le collagène et l'élastine.

Les glycoprotéines non collagéniques sont localisées dans des territoires tissulaires différents, la vitronectine est par exemple présente dans le sang, la laminine au sein des lames basales et la fibronectine est ubiquitaire. Bien qu'ayant des distributions différentes, ces protéines ont pour point commun leur organisation sous forme de multimères. Elles contiennent plusieurs sites de fixation pour les autres molécules de la MEC comme le collagène, pour des facteurs de croissance, mais également pour des récepteurs cellulaires membranaires comme les intégrines formant des complexes d'adhérence entre la cellule et sa MEC (Mouw et al., 2014).

Les larges glycoprotéines fibreuses comme le collagène et l'élastine confèrent des propriétés mécaniques de résistance et d'élasticité à la MEC. Le collagène est un élément majeur de la MEC, il représente 25% des protéines de l'organisme et possède plusieurs niveaux d'organisation (Kadler et al., 2007). Des bâtonnets de tropocollagène, chacun composé de trois chaînes alpha de collagène, peuvent s'assembler pour former des fibrilles de collagène qui s'associent elles-mêmes en fibres puis en faisceaux. Cette organisation particulière confère au collagène des propriétés de résistance à la tension importantes. Elle distingue différents types de collagène, 28 types identifiés chez les vertébrés, adaptés à un territoire tissulaire propre. Par exemple, le collagène IV est le composant majeur des membranes basales et le collagène X est un collagène à chaîne courte exprimé au sein du cartilage uniquement par les chondrocytes hypertrophiques (Gordon and Hahn, 2010; Mouw et al., 2014).

1.2 Les modifications et la dégradation de la MEC

Au cours de leur assemblage, les protéines de la MEC subissent des modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la transglutamination, la glycosylation ou la réticulation, ayant des conséquences sur la structure et les propriétés chimiques et mécaniques de la MEC. La réticulation est un processus chimique permettant l'association de plusieurs molécules entre elles par des liaisons covalentes. De nombreux éléments de la MEC comme la laminine, la fibronectine, l'élastine ou le collagène sont réticulés (Hynes and Naba, 2012). Les fibres de collagène sont par exemple réticulées en réseaux plus ou moins denses de façon enzymatique ou non-enzymatique (Tanzer, 1973). Les enzymes impliquées dans cette régulation sont principalement des lysyl-oxidases (LOX) qui catalysent une réaction de désamination oxydative des résidus lysine du collagène (Csiszar, 2001; Lucero and Kagan, 2006). La réticulation non enzymatique du collagène est médiée par transglutamination, glycation ou par l'augmentation des niveaux de protéoglycanes (Mosher and Schad, 1979; Schnider and Kohn, 1980; Wiberg et al., 2003).

Des enzymes protéolytiques modifient également la MEC. La MEC est un réseau dynamique constamment renouvelé par protéolyse et synthèse de nouveaux éléments. Elle est majoritairement dégradée par des métalloprotéases matricielles

(MMP pour Matrix Metalloproteinases), des endopeptidases, possédant un atome de zinc dans leur site catalytique, synthétisées par les cellules elles-mêmes. Les MMP, dont 23 membres ont été identifiés actuellement chez les vertébrés, possèdent chacune des substrats spécifiques mais sont capables dans leur ensemble de dégrader tous les éléments de la MEC (Fanjul-Fernández et al., 2010; Lu et al., 2011; Mott and Werb, 2004; Nagase et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007; Puente et al., 2003).

L'équilibre entre la dégradation et la synthèse d'éléments de la MEC est régulé de façon dynamique au cours du temps afin de pallier aux besoins de chaque tissu. La MEC subit donc un remodelage adaptatif nécessaire lors du développement ou pour la réparation d'une lésion tissulaire par exemple : les protéases dégradent la MEC lésée, libérant des peptides permettant d'attirer les cellules immunitaires sur le site de la lésion et favorisant la synthèse de nouveaux éléments de la MEC. Cependant, le remodelage peut devenir pathologique dans certains cas, comme lors de la stimulation exagérée de la synthèse des composants de la MEC qui peut conduire à une fibrose du tissu, entraînant généralement une dysfonction de l'organe atteint (Bonnans et al., 2014).

1.3 Les fonctions de la MEC

La MEC constitue donc un support physique essentiel pour les cellules permettant leur ancrage et leur organisation. Les protéines fibreuses de la MEC comme la fibronectine (Pankov and Yamada, 2002), la laminine ou le collagène sont des ligands pour les intégrines, récepteurs cellulaires formant les complexes d'adhérence de la cellule à sa MEC (Hynes, 1987; Mouw et al., 2014).

La MEC guide également la migration cellulaire. Les cellules peuvent migrer de façon protéolytique en dégradant la MEC ou de façon non-protéolytique en se déformant et en utilisant les éléments de la MEC comme supports de migration. En cas d'inflammation par exemple, les cellules immunitaires comme les monocytes ou les neutrophiles déforment leur corps cellulaire et leur noyau pour se frayer un passage à travers la lame basale des vaisseaux (Hallmann et al., 2015; Wolf and Friedl, 2011).

Grâce à ses propriétés mécaniques la MEC peut se déformer et absorber les chocs induits par des forces de compression et d'étirement, ce qui permet de protéger les cellules et de maintenir leur organisation. Mais la MEC n'a pas seulement un rôle structural. Elle régule également la diffusion et le stockage de molécules dans l'espace intercellulaire. Les lames basales par exemple jouent un rôle de filtre entre les cellules et le tissu conjonctif permettant de contrôler le passage de nutriments et de molécules. Elles peuvent également former des barrières sélectives délimitant différents compartiments cellulaires, comme dans la paroi vasculaire où une lame basale sépare les cellules musculaires lisses des cellules endothéliales (Halfter et al., 2015; Yurchenco, 2011).

La MEC est également un acteur à part entière dans les voies de signalisation contrôlant le comportement cellulaire. Les protéoglycanes peuvent notamment jouer le rôle de co-récepteurs en liant des facteurs de croissance comme l'epidermal growth factor, activateur de voies de signalisation intracellulaires régulant notamment la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire (Hynes, 2009). Ces mêmes voies peuvent également être activées par les interactions cellule/matrice *via* les intégrines (Legate et al., 2009).

1.4 Les propriétés mécaniques de la MEC : la rigidité

La MEC possède des propriétés d'élasticité, de compressibilité et de porosité, adaptées aux contraintes mécaniques externes auxquelles les tissus sont physiologiquement soumis (Buxboim et al., 2010). Parmi les propriétés mécaniques intrinsèques de la MEC, de nombreuses études récentes ont montré que la rigidité influence de façon importante le comportement cellulaire.

La rigidité est définie comme la résistance à une déformation d'après la loi d'élasticité formulée en 1679 par Robert Hooke (1635-1703) astronome, physicien et naturaliste anglais : « *Ut tensio, sic vis* », telle tension, telle force ; signifiant qu'il existe une proportionnalité entre les déformations élastiques d'un corps solide et les forces auxquelles celui-ci est soumis.

L'écriture mathématique de cette loi fut généralisée par le mathématicien français Augustin Louis Cauchy (1789-1857) et elle est aujourd'hui souvent écrite sous cette forme :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

σ : Contrainte (N.m^{-2})

E : Module de Young (N.m^{-2})

ε : Allongement relatif ou déformation (sans dimension)

Le module élastique ou module de Young caractérise la rigidité intrinsèque du matériau et correspond à la pente de la droite contrainte/déformation (Figure 2). C'est le physicien britannique Thomas Young (1773-1829) qui le premier démontra que la déformation globale d'une structure dépendait de sa forme, de sa taille et de sa raideur. Le module de Young est défini comme étant la contrainte mécanique qu'il faudrait appliquer pour doubler la longueur initiale du matériau. (Fortunier; Kittel, 1958).

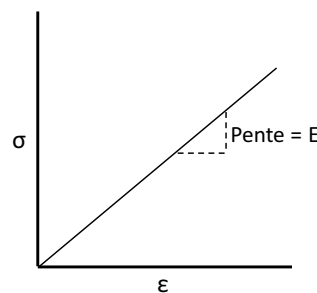


FIGURE 2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU DIAGRAMME CONTRAINTE/DÉFORMATION

Le module élastique E ou module de Young est la pente de la droite (d'après Wells, 2008).

La rigidité d'un organe ou d'un tissu, exprimée en Pascals ($\text{Pa} = \text{Newton/m}^2$), correspond à son module de Young (E) et peut donc être connue en appliquant une force sur une surface définie (σ) et en calculant la déformation qui en résulte (ε). Les modules élastiques des différents tissus et organes sont très variables et s'étendent sur une échelle allant de quelques Pascals pour le cerveau jusqu'au Gigapascal pour les os (Figure 3) (Barnes et al., 2017).

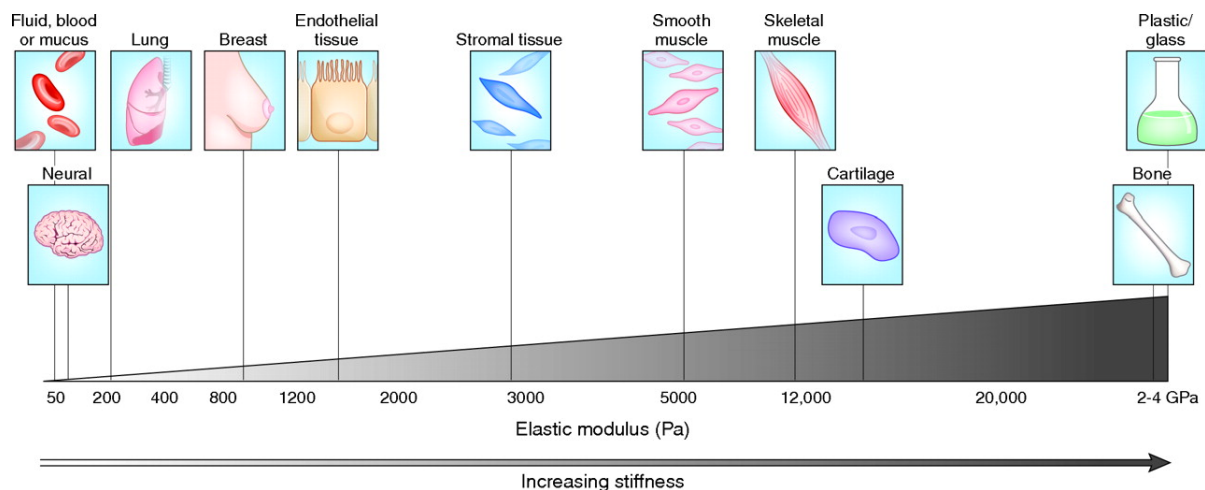


FIGURE 3 : ÉCHELLE REPRÉSENTANT L'ÉTENDUE DES RIGIDITÉS OU MODULES ÉLASTIQUES (EN PASCALS) DES DIFFÉRENTS TISSUS ET ORGANES DE L'ORGANISME HUMAIN

(Cox and Erler, 2011)

C'est principalement la rigidité de la MEC qui définit la rigidité d'un tissu. Cette rigidité est déterminée par la densité et l'organisation variables des différents éléments de la MEC entre eux, ainsi que par leurs propriétés mécaniques intrinsèques, leur taux d'hydratation et leurs modifications post-traductionnelles. Par exemple, l'expression élevée des LOX qui réticulent le collagène et l'élastine au niveau vasculaire et hépatique favorise l'augmentation de la rigidité de la MEC (Kagan, 2000; Murawaki et al., 1991; Sivakumar et al., 2008). Le dépôt de molécules au sein de la MEC peut également modifier la rigidité de la MEC. Par exemple, le dépôt de calcium au sein d'une matrice élastique rigidifie cette matrice (Lanzer et al., 2014).

La rigidité physiologique des tissus n'est cependant pas maintenue durant toute la vie de l'organisme. Elle varie au cours du développement et une rigidification de la MEC apparaît de façon naturelle et progressive lors du vieillissement, principalement au niveau vasculaire et cutané et peut conduire ou non au développement d'un état pathologique. De nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, le cancer du sein (Levental et al., 2009; Lu et al., 2012a; Paszek et al., 2005), la cirrhose hépatique (Georges et al., 2007; Issa et al., 2004; Wells, 2008), ou la fibrose pulmonaire idiopathique (Clarke et al., 2013; Parker et al., 2014) sont caractérisées par une rigidification de la MEC (Cox and Erler, 2011).

Les cellules produisent et dégradent la MEC, régulant ses propriétés mécaniques dont sa rigidité. Néanmoins, la rigidité de la MEC exerce en retour une influence sur le comportement cellulaire.

2. Les conséquences de la rigidité de la MEC sur le comportement cellulaire

Alors que l'influence des facteurs mécaniques sur les processus biologiques avait depuis longtemps été évoquée (Thompson, 1917; Wolff, 2010), c'est dans les années 1970 que les chercheurs commencent à observer le comportement cellulaire sur différents substrats de culture (Elsdale and Bard, 1972; Michalopoulos and Pitot, 1975). Jusqu'ici l'utilisation du plastique ou du verre, supports de culture cellulaire privilégiés encore aujourd'hui, ne permettait pas d'observer l'effet de changements des caractéristiques mécaniques de la MEC. De plus, ces matériaux aux modules élastiques de l'ordre du Gigapascal sont très rigides et ne constituent pas un environnement mécanique physiologiquement relevant. C'est le développement de supports de culture constitués de gels faits de polymères à rigidité variable qui a permis d'étudier l'effet de l'environnement mécanique tout en maintenant constant l'environnement chimique. L'utilisation de ces gels a également permis de se rapprocher de la rigidité physiologique d'un tissu et d'observer des comportements cellulaires invisibles ou faussés sur du plastique. Judah Folkman et Anne Moscona publient en 1978 l'une des premières études montrant une modification de la forme des cellules en fonction du substrat, fait de poly(2-hydroxyethyl methacrylate) de différentes densités, ainsi qu'un effet sur la synthèse d'ADN. Sur le substrat rigide, les cellules sont plus étalées et prolifèrent de façon plus importante (Folkman and Moscona, 1978). Des études ultérieures, montreront que la plupart des cellules adhérentes non transformées, peuvent également répondre à la rigidité de leur environnement, grâce à des mécanismes de « mécanotransduction », qui transmettent et convertissent les stimuli mécaniques en signaux chimiques (Discher et al., 2005; Hoffman et al., 2011). Ce phénomène met en jeu un système « senseur » de l'environnement mécanique, principalement composé des adhérences et du cytosquelette d'actine, dont l'activation se répercute ensuite sur de nombreux processus cellulaires qui influencent le comportement et le phénotype de la cellule (Figure 4).

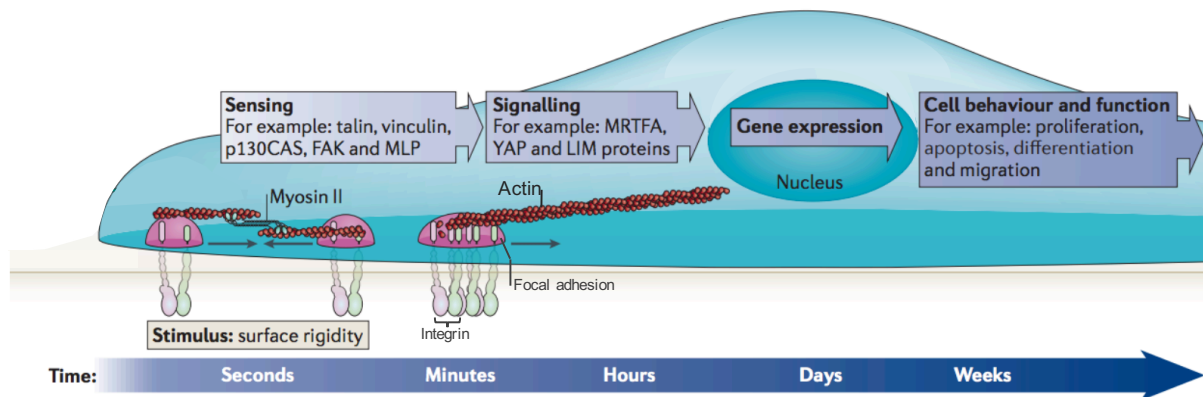


FIGURE 4 : ILLUSTRATION DU PROCESSUS DE MÉCANOTRANSDUCTION

La mécanotransduction désigne la conversion d'un stimulus mécanique, comme la rigidité de la MEC, en signaux chimiques, *via* les adhérences focales. Les senseurs des forces mécaniques sont activés en quelques secondes, suivis par l'expression de gènes modifiée après plusieurs heures, ce qui va ensuite changer le comportement et les fonctions cellulaires au bout de plusieurs jours voire plusieurs semaines à l'échelle du tissu (d'après Iskratsch et al., 2014).

2.1 La mécano-sensibilité de la rigidité

En servant de lien physique entre la MEC et le cytosquelette d'acto-myosine, les adhérences, dont la structure est sensible au stress mécanique, ont un rôle central au cours de la réponse cellulaire à la rigidité du microenvironnement (Bershadsky et al., 2003).

2.1.1 Les adhérences focales

Lorsque les cellules adhèrent et s'étalent sur un substrat, elles peuvent former différents types d'adhérences : des complexes focaux, des adhérences focales, des adhérences fibrillaires, des podosomes et des invadopodes. Les complexes focaux sont de petites structures subcellulaires punctiformes dynamiques d'environ 0,5-1 μm de longueur. Ils sont majoritairement présents au bord des lamellipodes et sont les précurseurs des adhérences focales qui peuvent elles-mêmes donner naissance à des adhérences fibrillaires. Les adhérences fibrillaires sont des structures de taille variable de 1 à 10 μm , longues ou punctiformes localisées au centre de la cellule. Elles sont liées spécifiquement aux fibrilles de fibronectine et sont enrichies en tensine.

Les podosomes et les invadopodes sont regroupés sous le terme de « podosome-type adhesion » ou invadosomes. Contrairement aux autres types d'adhérences qui s'organisent parallèlement à la surface de contact entre la cellule et la MEC, les invadosomes sont des structures cylindriques perpendiculaires à cette surface. Ils sont principalement observés dans des cellules en migration ayant un potentiel invasif, comme les cellules tumorales (Block et al., 2008; Geiger et al., 2001).

Les adhérences focales, sont de larges structures allongées de 2-5 μm de longueur, associées aux fibres de stress, de gros câbles créés par l'association de filaments d'actine et de myosine organisés parallèlement (Ridley and Hall, 1992). Elles sont composées de plus d'une centaine de protéines différentes constituant « l'adhésome » (Abercrombie and Dunn, 1975; Abercrombie et al., 1970; Curtis, 1964; Izzard and Lochner, 1976; Robertson et al., 2015; Tawil et al., 1993; Zaidel-Bar et al., 2007).

Les adhérences focales interagissent avec la MEC grâce aux intégrines, protéines transmembranaires composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Hynes, 1987; Katsumi et al., 2004; Miranti and Brugge, 2002; Tamkun et al., 1986). Leur domaine extracellulaire se lie aux protéines de la MEC en fonction des différentes combinaisons de sous-unités α/β . Par exemple, le complexe $\alpha_5\beta_1$ lie uniquement la fibronectine et le complexe $\alpha_{10}\beta_1$ le collagène et la laminine (Humphries et al., 2006; Jalali et al., 2001). Le domaine intracellulaire des intégrines interagit avec de nombreuses protéines dont certaines comme la taline ou l' α -actinine sont en lien direct avec le cytosquelette d'actine (Geiger et al., 2001; Horwitz et al., 1986; Liu et al., 2000; Otey et al., 1990; Winograd-Katz et al., 2014) (Figure 5).

La maturation des complexes focaux en adhérences focales consiste en une succession d'événements comprenant notamment : (i) le regroupement des intégrines en clusters, (ii) le recrutement de protéines d'adhérence dans le cytoplasme au niveau du domaine intracellulaire des intégrines, dont la Focal Adhesion Kinase (FAK), des kinases de la famille Src et la taline (Burridge and Connell, 1983), (iii) la formation de fibres de stress d'acto-myosine contractiles liées à la taline et (iv) l'activation de la FAK par auto-phosphorylation et phosphorylation sur tyrosine par les intégrines et les kinases de la famille Src (Calalb et al., 1995; Eide et al., 1995; Parsons, 2003; Schaller

et al., 1994). Cela favorise le recrutement d'autres protéines sur le site comme la vinculine (Burridge and Mangeat, 1984; Humphries et al., 2007), la paxilline (Deakin and Turner, 2008; Turner, 2000; Turner et al., 1990) et Crk-associated substrate (Cas ou p^{130} Cas) phosphorylées à leur tour par les kinases (Geiger et al., 2009; Iskratsch et al., 2014; Mitra et al., 2005; Panetti, 2002; Zaidel-Bar et al., 2007).

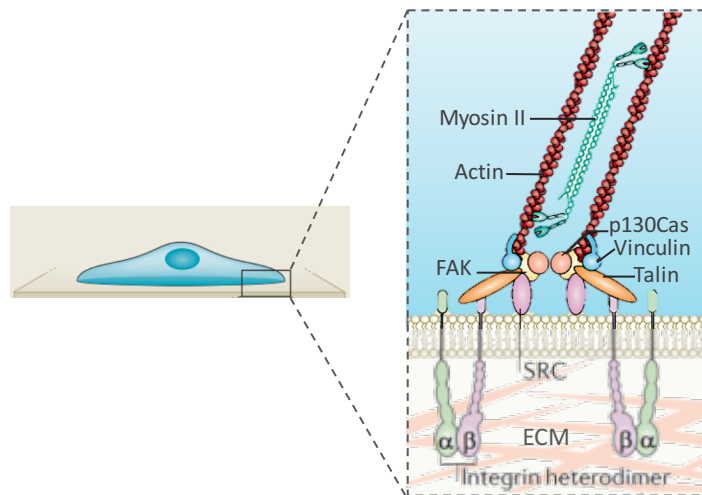


FIGURE 5 : SCHÉMA D'UNE ADHÉRENCE FOCALE

Adhérence focale composée d'intégrines au contact direct de la MEC et de nombreuses protéines dont la FAK, des kinases de la famille SRC, la taline, la vinculine et p^{130} Cas, liées au cytosquelette d'acto-myosine dans le cytoplasme (d'après DuFort et al., 2011).

L'assemblage et la maturation des adhérences dépendent de forces de tension qui peuvent être internes à la cellule générées par le cytosquelette d'acto-myosine *via* la voie des GTPases (enzymes hydrolysant le guanosine triphosphate) de la famille Rho (Ras homologue) (Barry and Critchley, 1994; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Ridley and Hall, 1992; Rottner et al., 1999; Wolfenson et al., 2011), ou de forces extérieures appliquées sur la cellule (Bershadsky et al., 2003; Galbraith et al., 2002; Geiger et al., 2009; Iskratsch et al., 2014; Ringer et al., 2017; Riveline et al., 2001; Schiller and Fässler, 2013; Walcott et al., 2011).

Les forces stimulent la maturation des adhérences, car certaines protéines d'adhérence comme les intégrines (Friedland et al., 2009), p^{130} Cas (Sawada et al., 2006) ou la taline (Kumar et al., 2016) possèdent une conformation sensible au stress mécanique qui, en réponse aux forces, provoque le recrutement d'autres protéines

d'adhérence et l'activation de voies de signalisation telles que la voie de la GTPase Ras homologue family member A (RhoA) (Riveline et al., 2001). La taline par exemple, est un senseur direct de la rigidité (Kumar et al., 2016). Elle possède des sites de liaison à la vinculine, cryptiques et inactifs à l'état natif. Sous l'effet de forces de tension, la taline change de conformation, ce qui expose les sites de liaison à la vinculine (Lee et al., 2007; del Rio et al., 2009). Son interaction avec la vinculine favorise le recrutement des intégrines et de la FAK phosphorylée et par conséquent le grossissement et le renforcement des adhérences. (Dumbauld et al., 2013; Elosegui-Artola et al., 2016; Roca-Cusachs et al., 2013; Sun et al., 2016; Yao et al., 2014). Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence que les forces de tension, ne sont pas suffisantes pour déclencher la maturation et la croissance des adhérences (Oakes et al., 2012). En effet, la polymérisation d'actine par les formines, semble être une étape importante et complémentaire afin de constituer une matrice d'actine qui permet le recrutement de protéines d'adhérence (Oakes et al., 2012).

Grâce aux protéines d'adhérence, les intégrines transmettent les forces générées par le cytosquelette d'acto-myosine à la MEC, permettant ainsi à la cellule de déformer sa MEC et d'en « percevoir » les propriétés mécaniques (Burridge et al., 1987; Hoffman et al., 2011; Shemesh et al., 2005; Wang et al., 1993).

2.1.2 Le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette constitue l'ossature de la cellule. Il est composé de trois types de filaments : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules.

Les filaments d'actine sont les plus fins (environ 7 nm de diamètre) et les plus souples du cytosquelette. Ils constituent un réseau très dynamique et sont formés par la polymérisation d'une répétition de monomères d'actine globulaire (actine-G) en hélices double brin (Egelman, 1985; Egelman et al., 1982). L'assemblage d'un filament d'actine (actine-F) dépend de la concentration en actine-G, en adénosine triphosphate (ATP) et en cations divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) dans le milieu. Il débute par une phase de nucléation correspondant au regroupement de trois monomères d'actine-G, stimulée par des nucléateurs tels que les formines ou le complexe actin-related protein-2/3

(Arp2/3). Le filament est ensuite élongué ou polymérisé par l'addition de monomères aux deux extrémités (Campellone and Welch, 2010). La polymérisation est cependant plus rapide à l'extrémité nommée pôle (+) ou barbée et plus lente à l'extrémité nommée pôle (-) ou pointue. Le complexe Arp2/3 polymérise des filaments d'actine branchés, en se plaçant comme nouveau point de polymérisation sur un filament déjà existant en formant un angle constant de 70° (Blanchoin et al., 2000; Machesky et al., 1994; Mullins et al., 1998; Svitkina and Borisy, 1999). Les formines polymérisent des filaments d'actine non branchés (Castrillon and Wasserman, 1994; Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002; Takeya et al., 2008; Watanabe et al., 1999) (Figure 6).

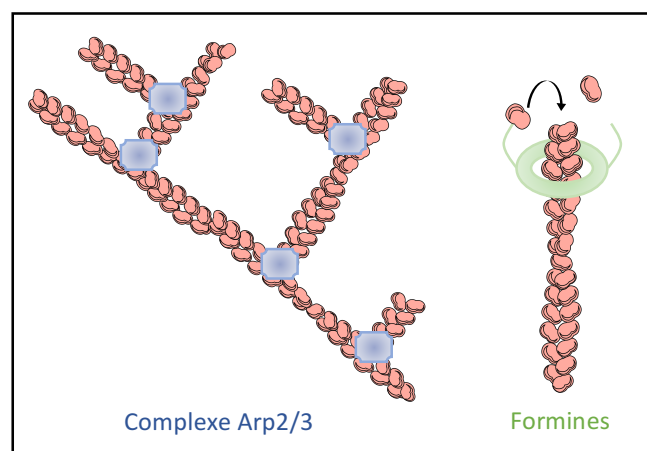


FIGURE 6 : LES FILAMENTS D'ACTINE BRANCHÉS ET NON BRANCHÉS

Le complexe Arp2/3 (en bleu), polymérise un réseau de filaments d'actine (en rouge) branchés présents au niveau des lamellipodes ou formant l'actine corticale. Les formines (en vert) génèrent des filaments non branchés constituant les filopodes et les fibres de stress.

La dépolymérisation des filaments est principalement contrôlée par les protéines de la famille des actin depolymerizing factor/cofiline (Bamburg et al., 1980; Lappalainen and Drubin, 1997; dos Remedios et al., 2003). Il existe différents niveaux d'organisation des filaments d'actine qui dépendent du type cellulaire et des besoins de la cellule pour réaliser une fonction particulière comme la migration ou la division (Pollard and Cooper, 2009; Small et al., 1998) (Figure 7). Les lamellipodes par exemple, constitués de nombreux filaments d'actine branchés, sont de larges extensions membranaires développées par la cellule pour explorer son environnement et migrer (Krause and Gautreau, 2014).

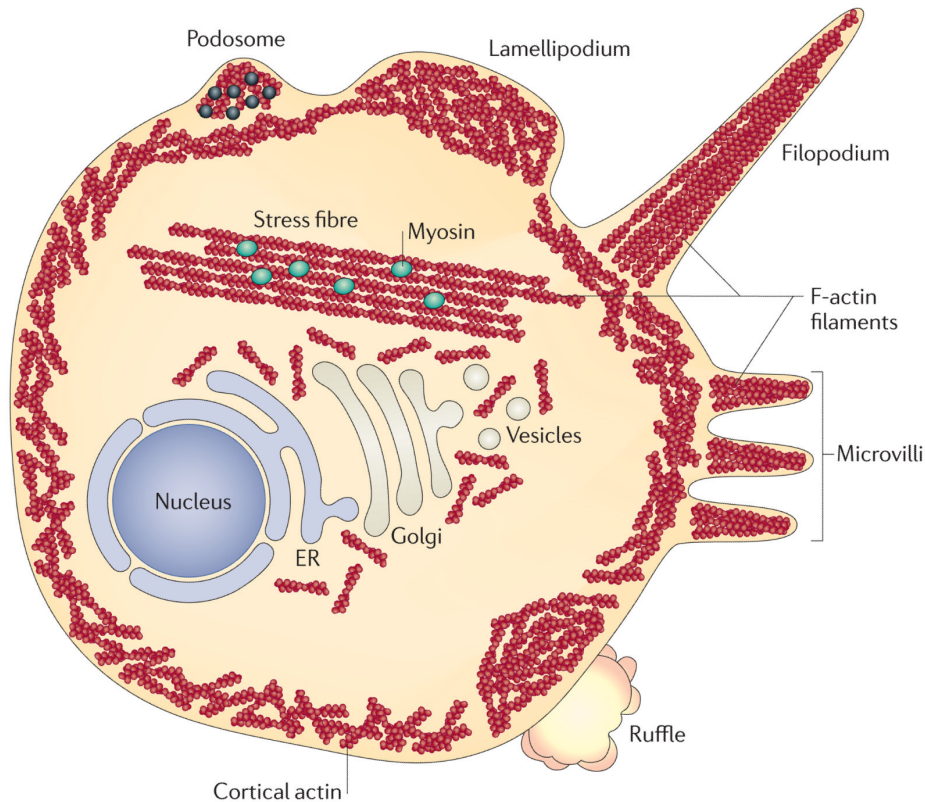


FIGURE 7 : SCHÉMA DE L'ORGANISATION DES FILAMENTS D'ACTINE EN DIFFÉRENTES STRUCTURES

Les fibres de stress sont de larges structures pouvant s'étendre sur toute la longueur de la cellule. La présence de myosine en leur sein permet leur contraction. L'actine corticale est un réseau peu organisé se trouvant sous la membrane plasmique. Les filaments d'actine permettent également à la cellule de produire de nombreuses extensions comme les lamellipodes, les filopodes, les rides membranaires, les microvillosités ou les podosomes contenant des molécules de signalisation et des protéines de liaison à l'actine (points noirs). ER : réticulum endoplasmique. (Taylor et al., 2011).

Les GTPases monomériques ou protéines G sont particulièrement impliquées dans l'organisation et la contraction du cytosquelette d'actine. Ces protéines qui hydrolysent le GTP fonctionnent comme des commutateurs moléculaires car elles évoluent entre une conformation inactive liée au GDP (Guanosine diphosphate) et une conformation active liée au GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001). Elles sont activées par des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) qui favorisent l'échange du GDP en GTP. Une fois activées, elles se lient à leurs effecteurs et les activent. Les protéines G sont subdivisées en familles. La famille Rho comprend notamment les protéines RhoA, Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) et Cell division control protein 42 homolog (Cdc42) qui régulent l'assemblage de l'actine en différentes structures. L'activation de Rac permet la formation de replis membranaires et de

lamellipodes (Ridley et al., 1992), l'activation de Cdc42 de filopodes (Kozma et al., 1995) et RhoA permet la formation et la contraction des fibres de stress. Le mouvement de la myosine le long des filaments d'actine induit la contraction des fibres de stress, mécanisme fondamental permettant la contraction des cellules musculaires (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Ridley and Hall, 1992) (Figure 8).

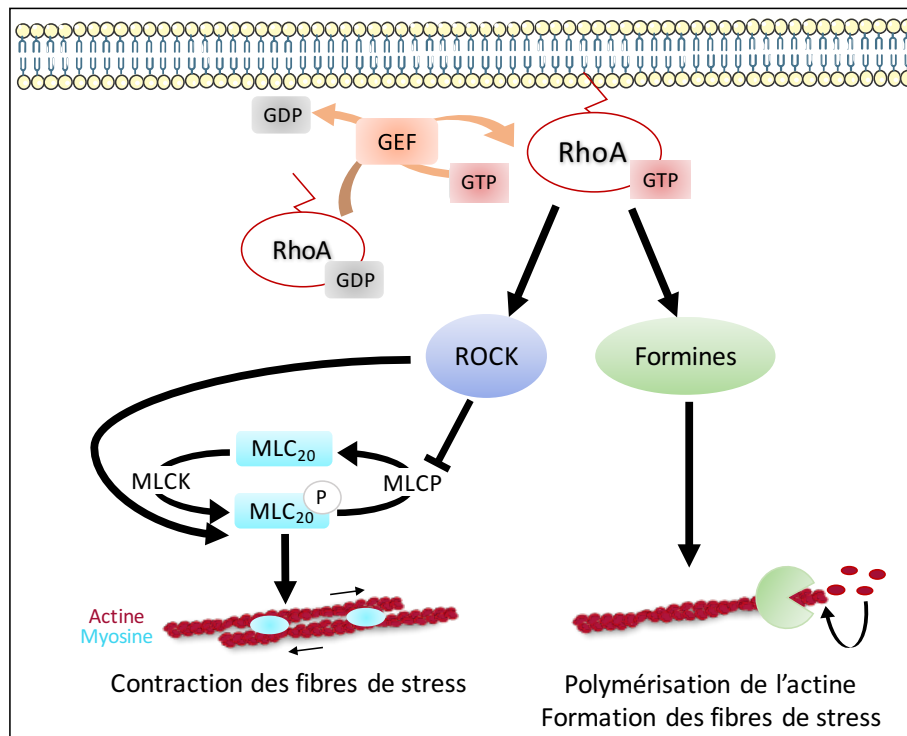


FIGURE 8 : LA GTPASE RHOA RÉGULE LA FORMATION ET LA CONTRACTION DES FIBRES DE STRESS

L'activation de RhoA par ses GEF va lui permettre d'activer son effecteur principal, la Rho-kinase (ROCK) qui phosphoryle la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP) ce qui l'inhibe et l'empêche de déphosphoryler la chaîne légère de la myosine (MLC₂₀) (Kimura et al., 1996). ROCK peut aussi directement phosphoryler la MLC₂₀ pour induire la contraction des fibres de stress (Amano et al., 1996). RhoA régule également la formation des fibres de stress en activant les formines (Kühn and Geyer, 2014).

2.1.3 Le remodelage des adhérences et du cytosquelette d'actine en réponse à la rigidité de la MEC

Robert Pelham and Ju-Li Wang ont été les premiers à montrer que la taille et la phosphorylation des adhérences focales sont régulées par les propriétés mécaniques de la MEC (Pelham and Wang, 1997). Dans des cellules épithéliales cultivées sur un

substrat rigide, la phosphorylation de protéines d'adhérence dont la paxilline est augmentée et les adhérences sont plus longues en comparaison avec des cellules cultivées sur un substrat souple ([Figure 9](#)).

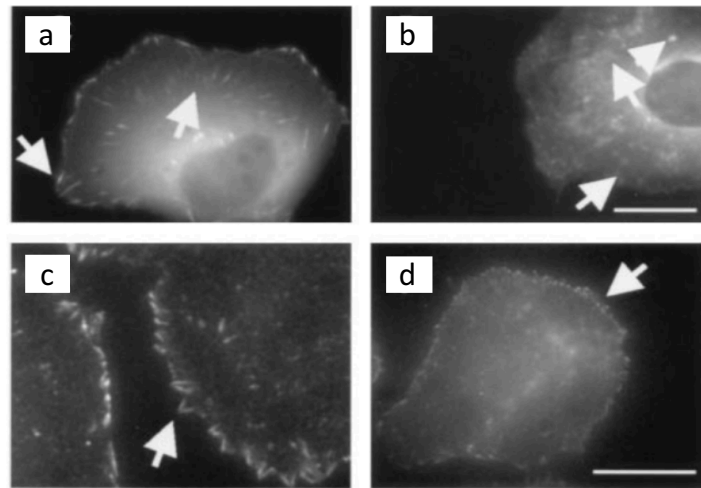


FIGURE 9 : LES ADHÉRENCES RÉPONDENT À LA RIGIDITÉ DE LA MEC

Distribution des protéines d'adhérence dans des cellules NRK cultivées sur des substrats de bis-acrylamide rigides (a et c) et souples (b et d). Sur le substrat rigide, la vinculine (a) et la phosphotyrosine (c) sont localisées au niveau d'adhérences focales longues et fusiformes. Sur le substrat souple, la vinculine (b) et la phosphotyrosine (d) sont présentes au niveau de petites structures punctiformes de taille irrégulière (b). Barre d'échelle = 10 μ m (Pelham and Wang, 1997).

Les cellules testent en permanence leur substrat d'ancrage et le déforment en exerçant des forces de traction sur celui-ci (Harris et al., 1980; Plotnikov et al., 2012). Des variations de la rigidité apparente en temps réel induisent un changement immédiat de la contractilité cellulaire. Les cellules exercent des forces de traction plus importantes en réponse à une augmentation de la rigidité apparente et ce en moins de 0,1 secondes (Mitrossilis et al., 2009). Plus la force de traction exercée par les cellules est élevée, plus la taille des adhérences augmente (Balaban et al., 2001). Les cellules exercent des forces de traction en contractant leur cytosquelette d'acto-myosine. Une tension plus importante au niveau du cytosquelette d'acto-myosine induit le recrutement de nouvelles protéines d'adhérences (Ballestrem et al., 2001; Carisey et al., 2013; Yamashita et al., 2014) conduisant au renforcement des liens entre le cytosquelette et les adhérences (Choquet et al., 1997; Giannone and Sheetz, 2006). L'inhibition de la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine par la blebbistatine, inhibiteur de la myosine-II, réduit drastiquement les forces de traction et empêche la

perception de la rigidité du substrat par les adhérences (Raab et al., 2012; Wu et al., 2017). La myosine-II est donc un acteur important dans l'assemblage et la stabilité des adhérences focales en réponse à la rigidité de la MEC (Choi et al., 2008; Pasapera et al., 2010).

L'activation de la myosine par la rigidité de la MEC semble faire intervenir au moins deux types de mécanismes : (i) des mécanismes rapides intrinsèques à la myosine II, indépendants des voies de signalisation (Mitrossilis et al., 2009; Schiller and Fässler, 2013; Uyeda et al., 2011) et (ii) des mécanismes dépendants de la protéine RhoA et de son effecteur ROCK.

Le mécanisme d'activation de RhoA par la rigidité de la MEC a été étudié plus en détail dans les fibroblastes (Schiller et al., 2013) dans lesquels RhoA est activée par deux types d'intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$, fonctionnant en coopération. L'activation de RhoA par $\alpha_5\beta_1$ stimule l'activité de ROCK, permettant d'induire la génération de forces de tension *via* l'activation de la myosine-II. En réponse à ces forces de tension appliquées sur les adhérences, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ recrutent un GEF de RhoA, GEF-H1 au niveau des adhérences. GEF-H1 stimule l'activité de RhoA qui active la formine Diaphanous (mDia) pour promouvoir la polymérisation d'actine et la maturation des adhérences (Guilluy et al., 2011; Kuo et al., 2011; Schiller et al., 2013). Ces deux voies d'activation sont complémentaires et fonctionnent en synergie pour adapter la structure de la cellule et sa contraction à la rigidité de l'environnement (Riveline et al., 2001; Schiller et al., 2013).

Parallèlement au remodelage des adhérences, l'organisation du cytosquelette d'actine et la forme des cellules changent en fonction de la rigidité de la MEC. Sur une matrice rigide, les cellules sont étalées et ont une morphologie « polarisée », suite à la redistribution des adhérences focales qui s'alignent dans l'axe du futur allongement de la cellule (Prager-Khoutorsky et al., 2011), elles forment des fibres de stress (Yeung et al., 2005). La formation des fibres de stress en réponse à la rigidité de la MEC survient concomitamment à la formation des adhérences focales et est régulée par les formines, effecteurs de la GTPase RhoA, permettant la polymérisation de l'actine par la nucléation de nouveaux filaments (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Icard-Arcizet et al., 2008; Takeya et al., 2008; Watanabe et al., 1997, 1999).

Sur une matrice souple, les cellules sont rondes et peu étalées, leur cytosquelette d'actine est un réseau désorganisé, ne présentant pas ou peu de fibres de stress et une plus grande quantité d'actine sous forme monomérique (Engler et al., 2004) (Figure 10).

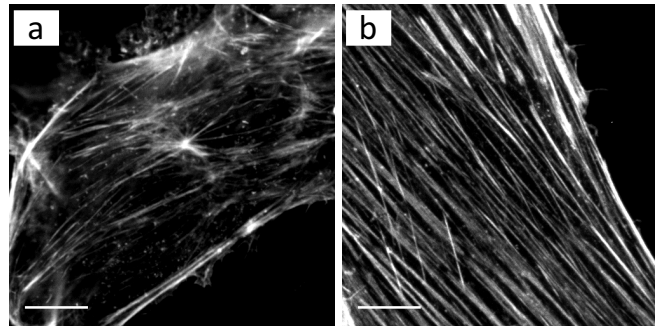


FIGURE 10 : L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE CHANGE DRASTIQUEMENT EN FONCTION DE LA RIGIDITÉ DE LA MEC

Marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine par immunofluorescence, dans des cellules musculaires lisses (A7R5) cultivées sur des matrices souples (1 kPa en a) et rigides (50 kPa en b) recouvertes de collagène. Sur une matrice rigide (b), l'actine s'organise en longues fibres de stress parallèles. Barre d'échelle : 10 μm .

Les réarrangements structuraux du cytosquelette en réponse à la rigidité sont associés à des modifications de la rigidité cellulaire majoritairement dépendante du cytosquelette d'actine. Le cytosquelette d'actine est sous tension à l'état basal et possède une rigidité propre correspondant à l'élasticité intrinsèque des filaments d'actine (Gardel et al., 2004; Gong et al., 2013). Cette tension interne, appelée aussi « prestress », est générée par les filaments d'acto-myosine contractiles et s'oppose à la résistance du substrat. Elle permet ainsi à la cellule d'adapter sa structure à l'environnement mécanique (Féréol et al., 2009; Gardel et al., 2006; Icard-Arcizet et al., 2008; Mitrossilis et al., 2009; Polte et al., 2004; Solon et al., 2007; Stamenović, 2005; Stamenović and Ingber, 2002). En réponse à la rigidité de la MEC, les forces de traction exercées par la cellule sur son substrat augmentent, ainsi que la rigidité du cortex cellulaire qui s'accroît jusqu'à atteindre une limite correspondant à la rigidité maximale pouvant être générée par le cytosquelette (Bieling et al., 2016; Tee et al., 2011; Wang et al., 1993).

Mais l'actine n'est pas le seul composant du cytosquelette affecté par la rigidité de la MEC. Celle-ci peut également induire le remodelage des microtubules (Heck et al., 2012) et des filaments intermédiaires (Swift et al., 2013), comme la lamine A/C, dont la stabilité est régulée en réponse aux forces générées par les filaments d'acto-myosine. L'ensemble des modifications de l'architecture cellulaire se répercute sur de nombreux processus cellulaires et participe à la régulation de nombreuses fonctions.

2.2 Les modifications des fonctions cellulaires en réponse à la rigidité de la MEC

Suite au remodelage des adhérences et du cytosquelette d'acto-myosine, la rigidité de la MEC influence de nombreuses fonctions cellulaires *via* des voies de signalisation activées au niveau des adhérences ou *via* la transmission d'influx mécaniques vers le noyau (Swift et al., 2013).

De nombreuses fonctions cellulaires ont été identifiées comme étant au moins en partie régulées par l'environnement mécanique. C'est le cas de la prolifération, la migration et la différenciation, toutes trois sous l'influence de la rigidité de la MEC.

2.2.1 La migration

La migration cellulaire est indispensable à la réalisation de nombreux processus physiologiques tels que le développement ou la réparation tissulaire. Il s'agit d'un phénomène dynamique durant lequel les adhérences et le cytosquelette, s'assemblent, se stabilisent, se déplacent et se désassemblent en quelques secondes (Theriot and Mitchison, 1991; Webb et al., 2002).

Il a été montré que sur un gel de polyacrylamide comportant deux zones contigües de rigidités différentes les cellules migrent vers la partie la plus rigide du gel. Si le front de migration cellulaire approche un substrat rigide, la cellule forme des lamellipodes pour migrer vers cette zone, si au contraire le front de migration approche un substrat mou, les protrusions membranaires se rétractent et la cellule change de direction (Lo et al., 2000; Pelham and Wang, 1997).

Ce phénomène appelé « durotaxie » témoigne de la « mécanosensibilité » des cellules, leur capacité à tester et « sentir » leur environnement mécanique (Figure 11).

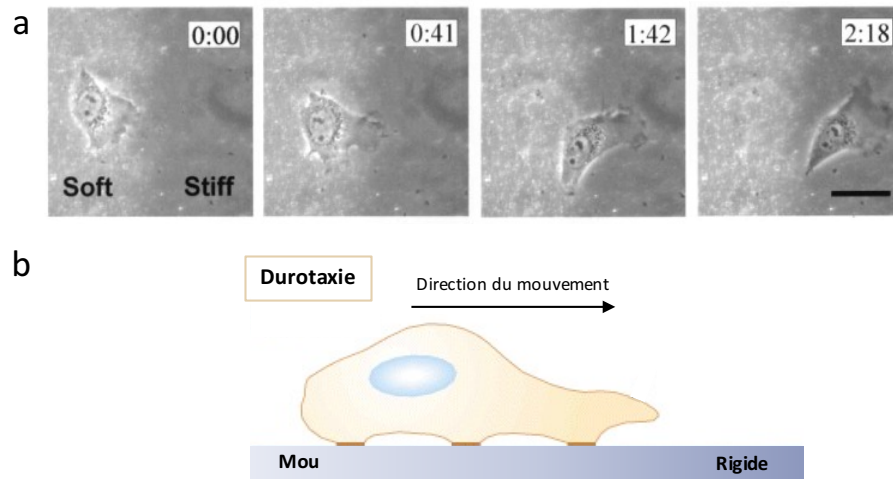


FIGURE 11 : LA DUROTAXIE

a. Mouvements de cellules 3T3 sur un substrat comportant un gradient de rigidité (mou sur la partie claire et rigide sur la partie foncée). Au cours du temps, les cellules migrent préférentiellement vers la partie rigide du substrat. Barre d'échelle : 40 μm (Lo et al., 2000) b. Schématisation du phénomène de durotaxie.

Lors de la durotaxie, certaines adhérences régissent la mécanosensibilité et exercent sur le substrat des forces de traction nanométriques de façon répétée et fluctuante *via* une voie dépendante de la FAK, la paxilline et la vinculine. Cela permet la déformation du substrat et ainsi guide la cellule très précisément vers la zone la plus rigide (Plotnikov et al., 2012). Une étude a mis en évidence l'existence de petites structures d'environ 1 μm , formées précocement lors du contact initial avec la matrice, avant l'assemblage d'adhérences matures et de fibres de stress. Ces structures composées de paxilline et de myosine permettraient à la cellule de « percevoir » la rigidité en déplaçant le substrat localement de 60 nm (Ghassemi et al., 2012). Il a également été montré que le cytosquelette d'actine jouait un rôle de mécanosenseur lors de la durotaxie (Trichet et al., 2012). La mécanosensibilité au cours de ce processus requiert donc à la fois des unités contractiles opérant à l'échelle nanométrique et des fibres de stress opérant à l'échelle de la cellule entière.

Au niveau moléculaire, la FAK et la myosine-II sont nécessaires à la durotaxie, qui devient impossible lorsque ces protéines sont déplétées (Raab et al., 2012; Swaminathan et al., 2016; Wang et al., 2001).

2.2.2 La prolifération et la survie cellulaire

Depuis les travaux de Judah Folkman et Anne Moscona (Folkman and Moscona, 1978), plusieurs publications ont mis en évidence l'importance de la rigidité de la MEC dans la régulation de la croissance cellulaire. Il est désormais admis que des cellules cultivées sur une matrice rigide ont une synthèse d'ADN accrue et prolifèrent davantage. Au contraire, les cellules cultivées sur une matrice souple synthétisent moins d'ADN, se divisent moins et déclenchent plus fréquemment leur apoptose (McDaniel et al., 2007; Wang et al., 2000). Deux mécanismes principaux ont été identifiés comme étant impliqués dans le contrôle de la prolifération en fonction de la rigidité de la MEC : l'un dépendant de la cycline-D1 et l'autre de la Yes-associated protein (YAP) et de son paralogue le transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ).

Richard Assoian et son équipe ont montré que la rigidité de la MEC régule la prolifération en augmentant la transcription et l'expression de la cycline-D1, une protéine qui permet la progression du cycle cellulaire en facilitant le passage de la phase G1 à la phase S (Assoian and Klein, 2008; Klein et al., 2009). D'une part, la rigidité augmente la transcription de la cycline-D1 *via* l'activation de la GTPase Rac dépendante de la FAK. D'autre part, l'augmentation de l'expression de la cycline-D1 en réponse à la rigidité stimule la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome, permettant la libération de facteurs de transcription nécessaires pour l'entrée en phase S. Ces travaux établissent également un lien entre la rigidité et la prolifération *in vivo*. En utilisant un modèle de lésion de l'artère fémorale chez la souris pour induire la prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs), les auteurs ont observé une rigidification du tissu au niveau des sites de prolifération cellulaire avec un degré de rigidité similaire à celui nécessaire pour induire la prolifération *in vitro* (Klein et al., 2009).

Le second mécanisme impliqué dans la régulation de la prolifération en réponse à la rigidité de la MEC dépend du complexe YAP/TAZ. Stefano Piccolo et son équipe ont montré que sur une matrice rigide, la tension exercée par le cytosquelette d'actomyosine *via* la voie de la GTPase RhoA induit la translocation du complexe YAP/TAZ du cytoplasme vers le noyau. Une fois dans le noyau, il interagit avec des facteurs de transcription à TEA domain (TEAD) pour co-activer l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie ou la différenciation cellulaire (Dupont et al., 2011; Halder et al., 2012) (Figure 12).

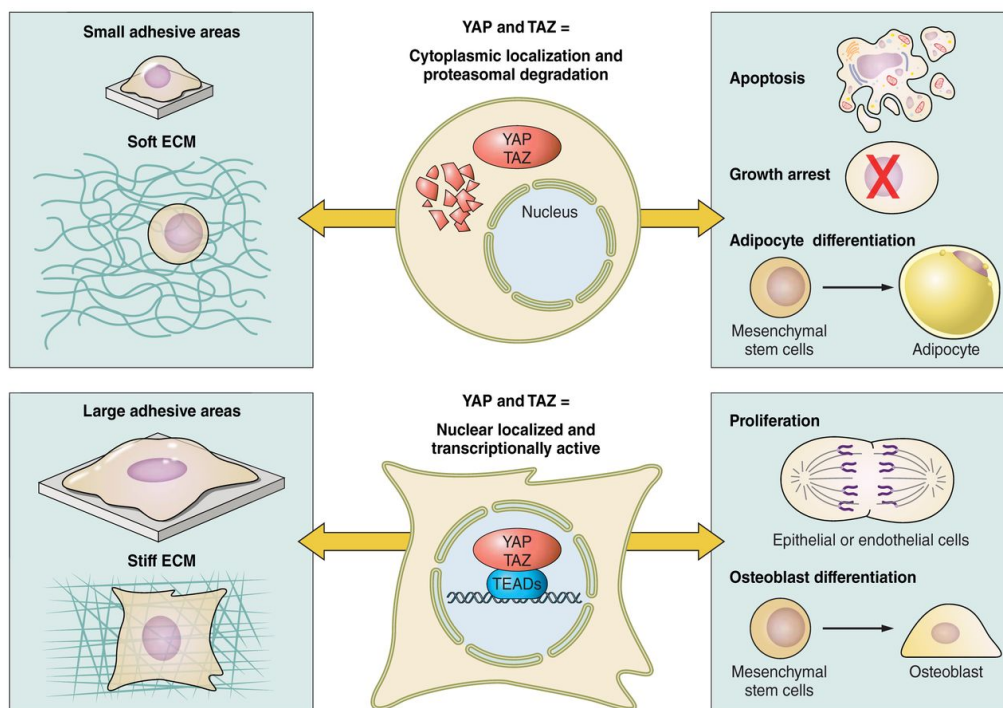


FIGURE 12 : LA RIGIDITÉ CONTRÔLE LA LOCALISATION DE YAP/TAZ ET SON ACTIVATION

Sur une matrice souple, YAP/TAZ est inactif dans le cytoplasme et sera dégradé, ce qui induit l'arrêt de la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses. Sur une matrice rigide, il se localise dans le noyau et va co-activer, avec les TEADs, la transcription de ses gènes cibles ce qui favorise la prolifération cellulaire et la différenciation ostéoblastique (Piccolo et al., 2014).

L'activation de la prolifération par YAP/TAZ sur une matrice rigide est non seulement indépendante de la voie Hippo, connue pour contrôler habituellement l'activité de YAP/TAZ, mais elle la domine. Elle domine aussi la voie Wnt et la voie des récepteurs couplés aux protéines G, également connues pour activer YAP/TAZ. En effet, ces voies ne sont pas suffisantes pour restaurer l'activation de la transcription

des cibles de YAP/TAZ sur une matrice souple. Seule la déplétion concomitante de régulateurs négatifs de l'actine filamenteuse comme la protéine CapZ (qui empêche l'élongation et la polymérisation des filaments d'actine) permet de rétablir leur transcription. En plus de réguler directement l'activité de YAP/TAZ, la rigidité contrôle donc également sa réponse aux cascades de signalisation (voie Wnt, voie Hippo et voie des récepteurs couplés aux protéines G) initiées par des facteurs de croissance solubles (Aragona et al., 2013). La même équipe a également montré que YAP/TAZ est impliqué dans une autre fonction cellulaire dépendante de la rigidité, la différenciation.

2.2.3 La différenciation

En 2006, Denis Discher et son équipe utilisent des gels de polyacrylamide, mimant les rigidités physiologiques de différents tissus, sur lesquels ils cultivent des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Engler et al., 2006). Ils observent alors que les cellules souches cultivées sur un substrat mou, mimant la rigidité du cerveau, se différencient en précurseurs neuronaux. En revanche, les cellules cultivées sur un substrat plus rigide, mimant le tissu musculaire, se transforment en cellules souches musculaires et celles cultivées sur un substrat très rigide comme l'os se différencient en ostéoblastes (Figure 13).

Ces travaux ont ouvert la voie à de nombreuses études confirmant l'effet majeur de la rigidité de la MEC sur la différenciation et montrant que la combinaison de l'environnement mécanique et des facteurs biochimiques, précédemment utilisés seuls, optimise la différenciation de nombreux types cellulaires. C'est le cas pour les neurones (Saha et al., 2008), les cardiomyocytes (Engler et al., 2008; Young et al., 2014), les ostéoblastes (Evans et al., 2009; Khatiwala et al., 2009), les adipocytes (Young et al., 2013) ou les cellules endothéliales (Kshitiz et al., 2012); à partir de différents types de cellules souches : des CSM (Engler et al., 2006), des cellules souches embryonnaires (Evans et al., 2009) ou des cellules souches pluripotentes induites (Smith et al., 2017).

Afin de découvrir les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation cellulaire dépendante de la rigidité, plusieurs études ont pris pour modèle les CSM,

ayant le potentiel de se différencier à la fois en adipocytes et en ostéocytes. Ces deux différenciations sont idéales pour observer les effets de la rigidité car elles nécessitent l'utilisation d'un substrat mou mimant le tissu adipeux d'un substrat rigide mimant l'os.

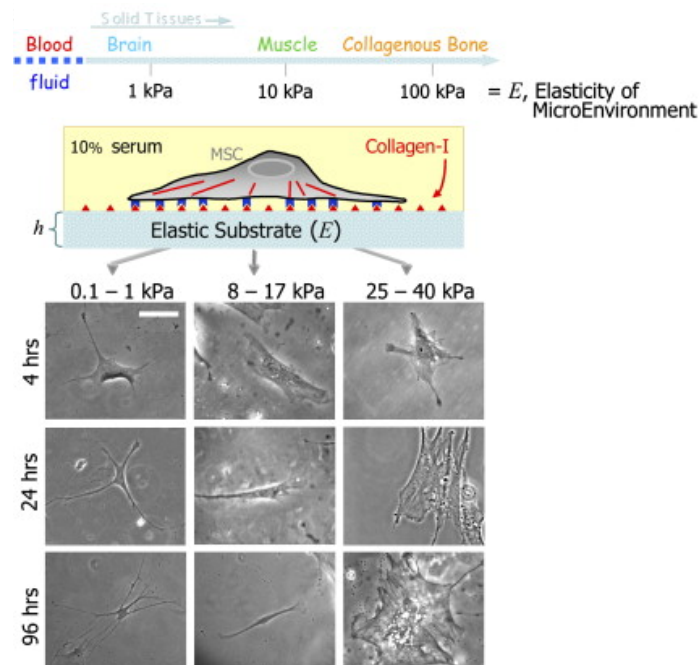


FIGURE 13 : LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE EST DIRIGÉE PAR LA RIGIDITÉ DE LA MEC

Après une semaine de culture, les cellules souches mésenchymateuses cultivées sur des matrices mimant la rigidité du cerveau (0,1-1 kPa), du muscle strié (8-17 kPa) et de l'os (25-40 kPa) se différencient respectivement vers les lignées neurogénique, myogénique et ostéogénique. Barre d'échelle : 20 μ m (Engler et al., 2006).

Sur une matrice rigide, il a ainsi été montré que l'expression de la lamine-A augmente (Swift et al., 2013) et que sa conformation change (Ihalainen et al., 2015) ce qui réduit sa phosphorylation et donc sa dégradation. L'augmentation de l'expression et de la stabilité de la lamine-A avec la rigidité favorise la différenciation ostéogénique et freine la différenciation adipogénique (Swift et al., 2013). Un autre mécanisme implique le complexe YAP/TAZ lui-même activé par la rigidité comme expliqué précédemment. Sa déplétion sur une matrice rigide rend impossible la différenciation ostéogénique et permet la différenciation adipogénique normalement impossible sur une matrice rigide (Dupont et al., 2011) (Figure 12). Des travaux récents suggèrent que ce mécanisme dépend notamment de la vinculine qui favorise la localisation nucléaire de TAZ sur matrice rigide pour inhiber la différenciation adipocytaire (Kuroda et al., 2017).

La rigidité de la MEC régule également la différenciation de manière négative, en contrôlant notamment la voie Notch (voie impliquée dans le développement embryonnaire) *via* YAP/TAZ. Elle permet aux cellules souches de l'épiderme de rester dans un état non-différencié (Totaro et al., 2017). De plus, il a été montré que l'utilisation de substrats mimant les propriétés mécaniques de la niche (microenvironnement spécialisé au sein d'un organe où sont localisées les cellules souches) favorise l'autorenouvellement des cellules souches (Chowdhury et al., 2010; Gilbert et al., 2010). L'environnement mécanique est donc un élément crucial dans le maintien des principales caractéristiques définissant le potentiel « souche » d'une cellule : la capacité à se différencier et l'autorenouvellement.

3. Exemple de la physiopathologie de la MEC de la paroi vasculaire

3.1 La structure des vaisseaux

L'arbre vasculaire assurant la circulation sanguine dans tout l'organisme se compose de vaisseaux sanguins, veines et artères, formés de trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice (Figure 14). Cette architecture est constante dans tout l'organisme, seule la proportion des tuniques change en fonction du type de vaisseau et du territoire vasculaire.

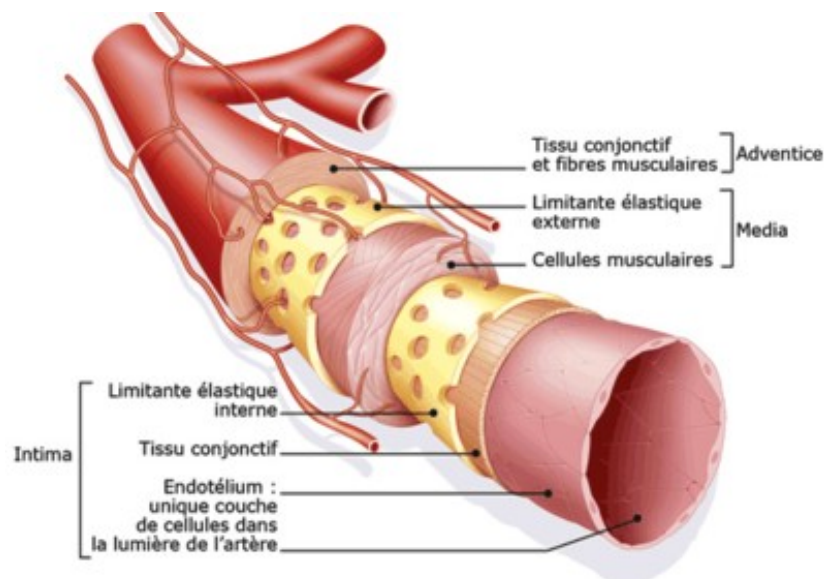


FIGURE 14 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE D'UNE ARTÈRE DE MOYEN CALIBRE AVEC SES TROIS TUNIQUES

(Sanofi-Aventis France)

L'intima est composée d'une mono-couche de cellules endothéliales juxtaposées en forme de mosaïque directement au contact du flux sanguin. Elle repose sur une MEC, la lame basale, et sur une fine couche de tissu conjonctif. La lame basale est constituée principalement de microfibrilles de collagène de type IV et de glycoprotéines comme la laminine.

La média est limitée de part et d'autre par des lames élastiques appelées limitante élastique interne et limitante élastique externe. Elle contient exclusivement des cellules musculaires lisses (CMLs), cellules contractiles de la paroi vasculaire, enchâssées dans une MEC faite de protéoglycanes, de fibres de collagène et d'élastine. Dans les artères de conductance de gros calibre comme l'aorte, la média s'organise en feuillets élastiques superposés parallèles et concentriques entre lesquels on trouve les CMLs. Le nombre de lames élastiques est proportionnel au diamètre du vaisseau. Les artères de gros calibre possèdent ainsi une paroi plus riche en élastine, ce qui leur confère des propriétés élastiques leur permettant de résister aux contraintes mécaniques imposées par le débit sanguin.

L'adventice est un tissu de soutien périphérique constitué de collagène de type I et II, de fibres élastiques ainsi que de différents types cellulaires : des fibroblastes, des cellules adipeuses et des macrophages. La présence de petits vaisseaux sanguins, lymphatiques et de fibres nerveuses assure l'irrigation et l'innervation de la paroi vasculaire (Schulte et al., 2016).

3.2 Le remodelage artériel lié au vieillissement

La paroi vasculaire subit des modifications biochimiques et biomécaniques avec l'âge se traduisant par une rigidification globale de la MEC pouvant devenir pathologique (Kovacic et al., 2011; Ponticos and Smith, 2014; Ziemann et al., 2005). Des défauts de la MEC induits par des mutations génétiques peuvent également conduire à un remodelage de la paroi vasculaire (Laurent et al., 2005; van Vark et al., 2012). Par exemple, le syndrome de Williams est causé par une mutation sur le gène codant pour l'élastine ce qui induit une réduction de l'élasticité artérielle et provoque une rigidification de la paroi vasculaire chez les patients atteints (Broder et al., 1999; Kozel et al., 2014). À l'inverse le syndrome d'Ehlers-Danlos de type IV, causé par des

mutations sur le gène codant pour le collagène, est caractérisé par une fragilité de la paroi vasculaire augmentant le risque de développement et de rupture d'anévrismes chez ces patients (Löhler et al., 1984; Mattar et al., 1994).

L'hypertension artérielle systolique isolée associée au vieillissement est un bon exemple des conséquences fonctionnelles directes d'une rigidification excessive de la MEC. En effet, l'impédance aortique (résistance opposée par l'aorte à l'éjection du ventricule gauche pendant la systole) augmente en réponse à la rigidité de la paroi vasculaire et provoque ainsi une augmentation de la pression systolique induisant l'hypertension (Bots et al., 1993; Cecelja and Chowienczyk, 2012; Lim and Townsend, 2009; O'Rourke and Nichols, 2005).

L'hypertension artérielle systolique isolée touche plus de 60% des personnes âgées de plus de 65 ans et correspond à une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg associée à une pression artérielle diastolique inférieure à 90 mmHg (Briones et al., 2010; Franklin, 2006; Franklin et al., 1997; Lemarié et al., 2010). Le remodelage artériel à l'origine de cette pathologie apparaît naturellement au cours du vieillissement et se traduit au niveau de la MEC par :

- La déstructuration du réseau élastique et une calcification médiale

L'impact des cycles cardiaques répétés induit une fatigue du réseau élastique et une fragmentation de l'élastine (Avolio et al., 1998; O'Rourke and Hashimoto, 2007). De plus, la dégradation de l'élastine est accrue avec l'âge car l'activité des élastases et des MMP augmente (Galis and Khatri, 2002; Jacob, 2003; Kielty, 2006; Qin et al., 2006; Yasmin et al., 2005). La fragmentation de l'élastine et sa dégradation par les MMP augmente sa polarité ce qui la rend plus affine au calcium et provoque l'élastocalcinose. Ce type de calcification au sein de la média, indépendant de la calcification liée aux athéromes, augmente de 30 à 40 fois entre l'âge de 20 ans et de 90 ans et est également causé par des modifications du phénotype des CMLs détaillées plus bas (Basalyga et al., 2004; Brooke et al., 2003; Dao et al., 2005; Karnik et al., 2003).

- L'altération de la balance synthèse/dégradation des éléments de la MEC

Un déséquilibre dans la proportion des différents éléments de la MEC est observé avec l'âge. La proportion d'élastine diminue au profit de l'augmentation de la proportion de collagène et d'autres constituants dont les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes, la fibronectine et la laminine. La conséquence majeure de ce déséquilibre est une fibrose de la paroi artérielle qui va s'épaissir d'un facteur 2 à 3 entre 20 et 90 ans (Brüel et al., 1998; Jacob, 2006).

- La glycation non enzymatique des protéines

Les protéines de la MEC ont une demi-vie très longue, jusqu'à 100 ans pour le collagène dans les tendons, ce qui les rend particulièrement sujettes à la glycation (Gineyts et al., 2000; Verzijl et al., 2000). La glycation, par réaction entre un ose d'un sucre réducteur comme le glucose et un résidu lysine d'une protéine, forme une base de Schiff puis un produit d'Amadori qui va s'oxyder de façon non réversible et se transformer en produit de glycation avancée ou AGE (Advanced Glycation End Products). Ces AGE vont s'accumuler dans la paroi artérielle et favoriser la réticulation des protéines de la MEC, les rendant plus résistantes à la protéolyse et à l'étirement (Avery and Bailey, 2005; Brüel et al., 1998; Konova et al., 2004; Reiser et al., 1992; Robins, 2007).

Ces altérations de la MEC sont couplées à des modifications du phénotype cellulaire en raison du dialogue étroit entre les cellules et la MEC qui les entoure. Les CMLs sont particulièrement touchées par ces altérations et participent activement au remodelage de la paroi (Lacolley et al., 2012; Sehgel et al., 2015; Wang et al., 2010). Elles s'hypertrophient et perdent peu à peu leur phénotype contractile au profit d'un phénotype sécrétant. Elles expriment alors moins de protéines contractiles comme l'actine ou la myosine et sécrètent de façon accrue des protéines de la MEC comme le collagène, ce qui entretient la fibrose (McDaniel et al., 2007; O'Callaghan and Williams, 2000). À l'acquisition de ce phénotype sécrétant s'ajoute un autre changement phénotypique, pro-calcifiant. Les CMLs expriment des protéines telles que la phosphatase alcaline, la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine marqueurs de l'ostéogénèse (Speer et al., 2009). Le dépôt de ces protéines au sein de la MEC favorise la calcification médiale (Lanzer et al., 2014). Les CMLs âgées expriment également plus de MMP ce qui contribue à la dégradation de l'élastine dont la

fragmentation en peptides solubles stimule le phénotype ostéogénique des cellules (Maquart et al., 2005; Simionescu et al., 2005; Watson et al., 1994). Au niveau fonctionnel, la rigidité de la MEC favorise la prolifération des CMLs et leur migration anormale vers l'intima, facilitée par les brèches créées par la fragmentation des lames élastiques (Gennaro et al., 2003; Peyton and Putnam, 2005) (Figure 15).

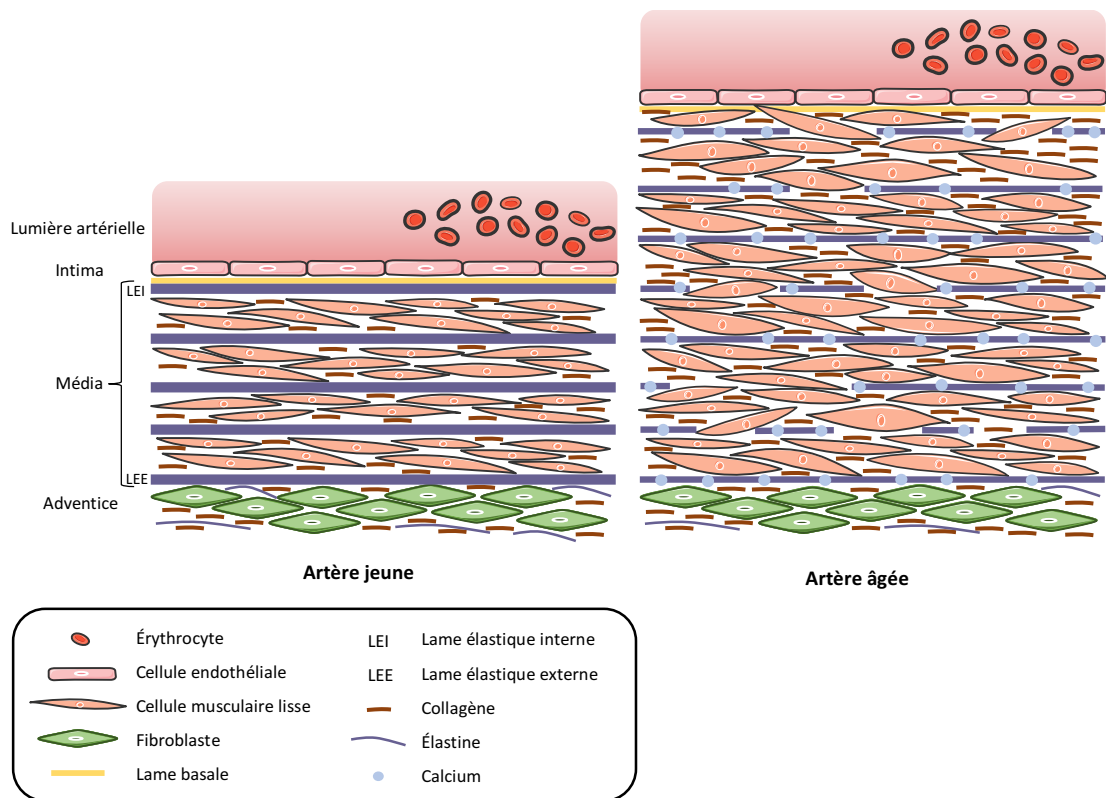


FIGURE 15 : SCHÉMA DES MODIFICATIONS DE LA PAROI ARTÉRIELLE AU COURS DU VIEILLISSEMENT

(d'après Jacob, 2006)

La perturbation majeure observée au niveau des cellules endothéliales lors du vieillissement est un déséquilibre entre la libération des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Les cellules produisent moins de monoxyde d'azote, nécessaire à la vasodilatation dépendante de l'endothélium et davantage d'endothéline, puissant vasoconstricteur. Cela contribue à l'augmentation du tonus vasculaire, de la pression artérielle et donc de la rigidité (Berkowitz et al., 2003; Donato et al., 2007; Hamilton et al., 2001). De plus, il a été montré que l'endothéline et le monoxyde d'azote sont impliqués dans la calcification médiale et la fibrose de la paroi vasculaire (Callaghan and Lee, 2017; Dupuis et al., 2004; Essalihi et al., 2005; Tesaro et al., 2017).

Toutes ces modifications montrent nettement que le remodelage de la paroi vasculaire est ainsi auto-entretenu à la manière d'un cercle vicieux, la rigidification de la MEC ayant un impact sur le phénotype cellulaire et réciproquement.

Les cellules et la rigidité de leur microenvironnement

En résumé

- La **MEC** est un **réseau dynamique** et complexe de macromolécules possédant des **propriétés biochimiques** et **mécaniques** propres au sein duquel sont organisées les cellules. Les cellules **sécrètent la MEC** qui **régule leur phénotype et leur comportement** en retour.
- La **rigidité** d'un tissu dépend principalement de la rigidité de la MEC qui le compose et **varie** de façon **physiologique** au cours du **développement** et lors du **vieillissement** mais est également un **marqueur** de nombreuses **maladies** comme **l'hypertension artérielle systolique isolée**.
- Les cellules perçoivent les **signaux mécaniques** et physiques de leur environnement tels que la rigidité de la MEC et sont capables de les **convertir en signaux chimiques** selon le principe de **mécanotransduction**. Ces signaux **influencent le phénotype** et les **fonctions cellulaires**.
- Les **adhérences focales** et le **cytosquelette d'actine** sont des structures impliquées dans la **perception** et la **transmission** des forces au sein de la cellule. Sur un **substrat rigide**, la cellule forme de **plus grandes adhérences focales** et son cytosquelette d'actine s'organise sous la forme de **fibres de stress**.
- La **rigidité de la MEC** modifie **l'expression de gènes** pour diriger la **différenciation des cellules souches** et induire la **prolifération cellulaire**.

II. La mitose : réorganisation mécanique de la cellule

Le cycle de division des organismes eucaryotes ou cycle cellulaire s'articule en plusieurs étapes (Figure 16) : la synthèse de composants cellulaires (phases G1 et G2) et la duplication du matériel génétique (phase S) constituent l'interphase, et la phase de division cellulaire proprement dite, la mitose (Cooper, 2000). La mitose est le processus lors duquel, une cellule mère se divise pour donner deux cellules filles génétiquement identiques.

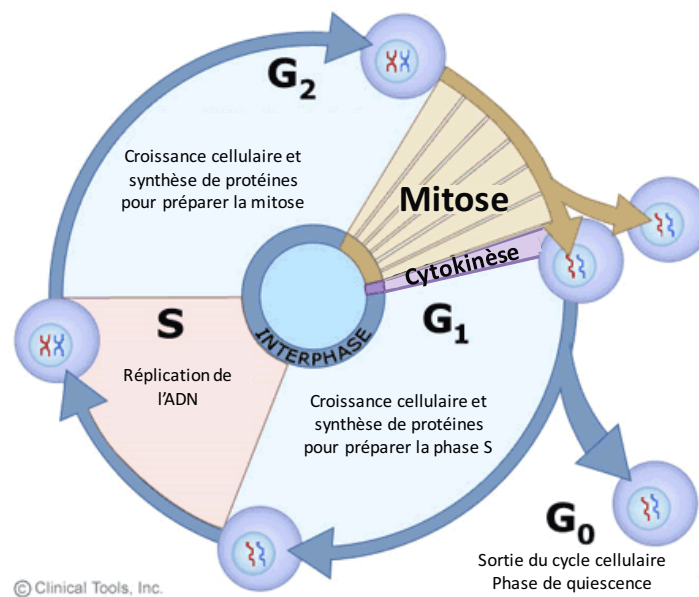


FIGURE 16 : LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE

1. La progression mitotique

1.1 Les phases de la mitose

La division cellulaire fut observée pour la première fois en 1842 par Karl Wilhelm von Nägeli (1817-1891), botaniste suisse, qui à l'époque avait interprété ce phénomène comme une anomalie (Carlier et al., 2012). C'est Walther Flemming, biologiste allemand (1843-1905), qui 40 ans plus tard décrit pour la première fois les étapes de la mitose dans son livre « *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* » (Flemming, 1882) (Figure 17). Il identifie une structure très affine aux colorants qu'il nomme « chromatine » (du grec « khrôma » = couleur) et remarque qu'elle se transforme en filaments lors de la division cellulaire, qu'il décide alors de nommer « mitose » (du grec

« mitos » = filament). Les étapes de la mitose décrites par Walther Flemming sont identiques à celles que nous connaissons aujourd'hui et sont détaillées dans le tableau ci-après ([Tableau I](#)).

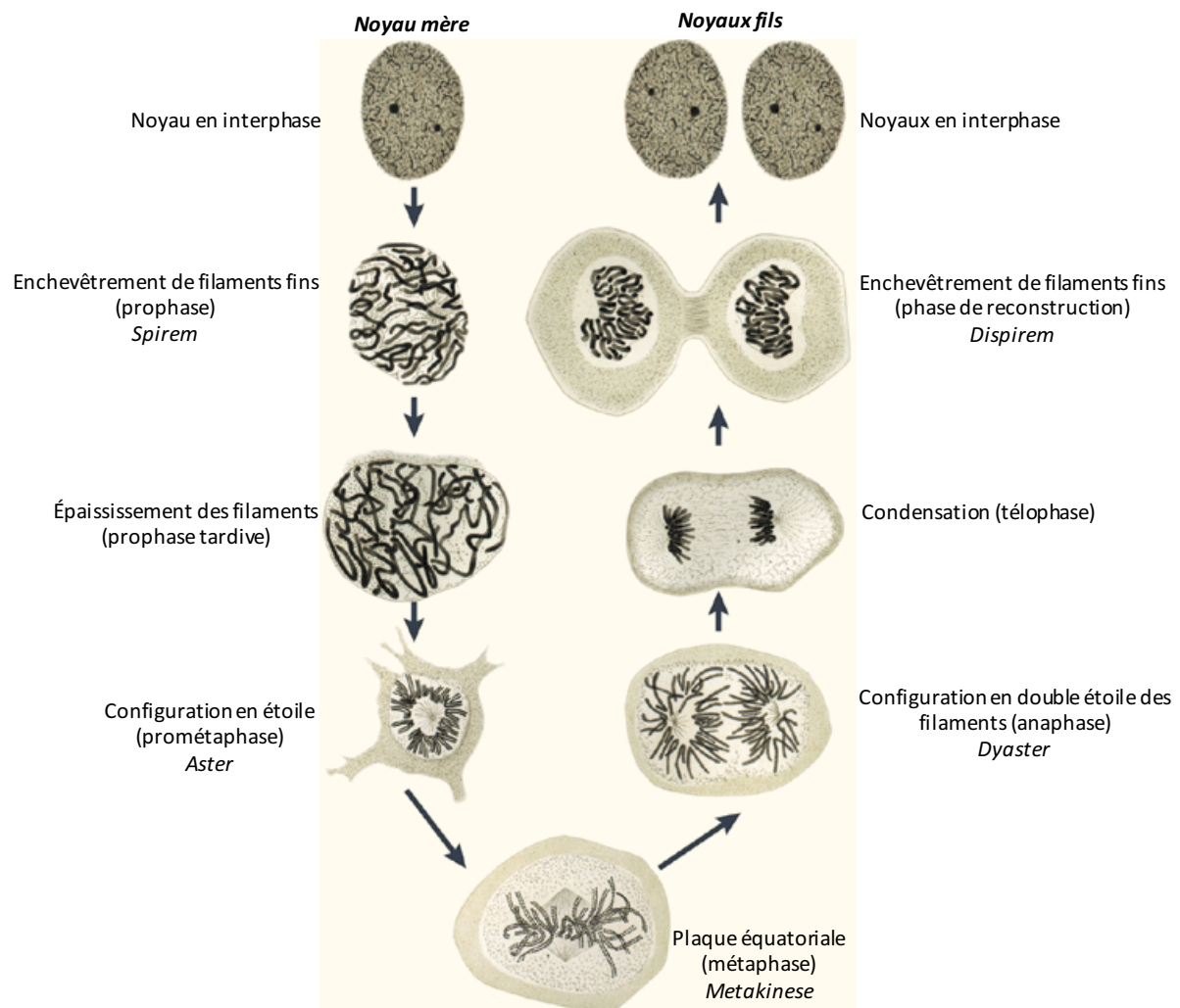


FIGURE 17 : DESCRIPTION DES PHASES DE LA MITOSE PAR WALTHER FLEMMING

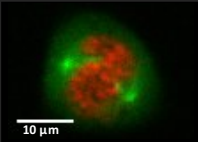
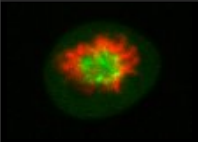
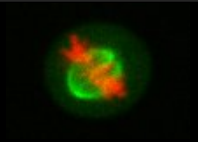
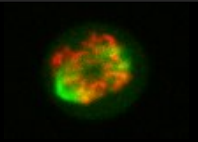
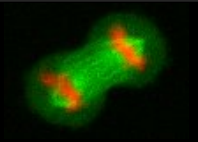
Flemming distingue une phase « progressive » durant laquelle des filaments se forment dans le noyau mère et vont s'aligner au centre de la cellule et une phase « régressive » débutant par la séparation des filaments en deux groupes et se terminant par l'apparition des noyaux fils (Flemming, 1882; Paweletz, 2001).

La durée de la mitose est très variable selon les espèces et le type cellulaire, elle est d'environ une heure pour des cellules humaines en culture comme les cellules HeLa. Elle dépend également de la satisfaction du point de contrôle du fuseau mitotique, régulateur essentiel permettant la répartition équitable du matériel génétique entre les deux cellules filles (Foley and Kapoor, 2013).

Chez les eucaryotes, les mécanismes de division varient selon les organismes, mais nécessitent la mise en place du fuseau mitotique dont l'assemblage et la stabilité sont décrits dans les paragraphes suivants pour les cellules animales.

TABLEAU I : Les cinq phases de la mitose suivies de la cytokinèse, « division cytoplasmique » permettant la séparation finale des deux cellules filles.

Les images représentant les différentes phases ont été réalisées en microscopie confocale avec des cellules HeLa Kyoto exprimant constitutivement la EGFP- α -tubuline (vert) et l'histone H2B-mCherry (rouge).

Prophase	Prométaphase	Métaphase	Anaphase	Télophase	Cytokinèse
					
• L'ADN se condense pour former les chromosomes chacun composé de deux chromatides sœurs soudées par le centromère • Le centrosome (centre organisateur des microtubules) se duplique et les deux centrosomes migrent vers chaque pôle de la cellule • Les microtubules polymérisent à partir des centrosomes et commencent à former le fuseau mitotique, structure s'étendant entre les deux centrosomes permettant l'alignement des chromosomes au centre de la cellule puis la séparation égale des chromatides sœurs • L'enveloppe nucléaire se déforme et s'invagine	• L'enveloppe nucléaire se rompt • La condensation des chromosomes est complète • Les kinétochores, assemblages supramoléculaires permettant l'attachement des chromosomes aux microtubules, se forment au niveau des régions centromériques des chromosomes • Les microtubules s'attachent aux kinétochores pour "capturer" les chromosomes	• Le fuseau mitotique aligne tous les chromosomes à l'équateur de la cellule formant la plaque métaphasique ou équatoriale	• Les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule, "tirées" par les microtubules du fuseau	• Deux nouvelles enveloppes nucléaires se forment autour des chromosomes • Les chromosomes se décondensent et reprennent leur forme filamenteuse • Le fuseau mitotique disparaît	• Un anneau contractile composé d'actine et de myosine permet l'invagination de la membrane plasmique, formant un sillon de division qui se creuse jusqu'à la séparation des deux cellules filles • Les deux cellules filles ont chacune le même matériel génétique que la cellule mère

Point de contrôle du fuseau mitotique

1.2 Le fuseau mitotique

Le fuseau mitotique est la structure mise en place par la cellule en mitose pour assurer la bonne ségrégation du matériel génétique dans les cellules filles. Il permet l'alignement des chromosomes à l'équateur de la cellule en métaphase et la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase. Le fuseau mitotique définit également la position du sillon de clivage lors de la cytokinèse. Il est composé principalement de microtubules, de protéines associées aux microtubules et de protéines motrices comme la kinésine et la dynéine (Prosser and Pelletier, 2017).

Les microtubules sont des tubes creux polymérisés à partir d'hétérodimères de tubuline, constitués d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Ces hétérodimères sont assemblés en protofilaments qui s'associent pour former un microtubule. Comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures polarisées possédant une extrémité (-) associée au centrosome et une extrémité (+) libre dans le cytoplasme (Lodish et al., 2000; Wade and Hyman, 1997). Les microtubules constituant le fuseau sont différenciés en trois classes (Figure 18) :

- *Les microtubules kinétochoriens* s'associent aux kinétochores, des complexes protéiques au niveau des régions centromériques des chromosomes. Ils alignent les chromosomes à l'équateur de la cellule (McDonald et al., 1992).

- *Les microtubules interpolaires* émanent des centrosomes opposés et s'intercalent au milieu du fuseau. Ils contrôlent la symétrie bipolaire du fuseau mitotique (Mastronarde et al., 1993).

- *Les microtubules astraux* irradiant dans toutes les directions et sont impliqués dans la génération des forces permettant la séparation des pôles lors de l'anaphase. Leur ancrage au niveau du cortex d'acto-myosine leur permet d'orienter le fuseau mitotique (Grill et al., 2003).

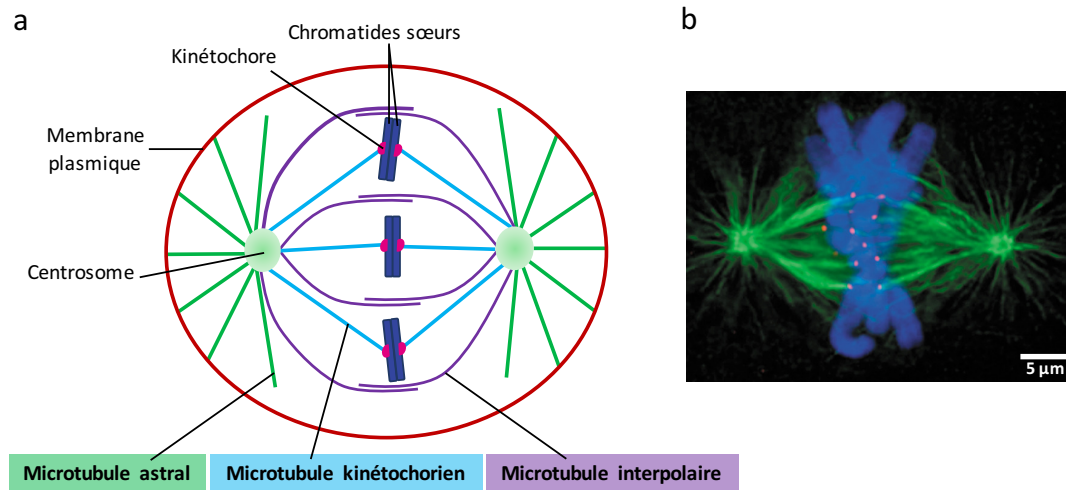


FIGURE 18 : LES MICROTUBULES DU FUSEAU MITOTIQUE

a. Schéma du fuseau mitotique composé de trois types de microtubules : les microtubules astraux, kinétochoriens et interpolaires b. Fuseau mitotique en microscopie à fluorescence. Les microtubules sont marqués en vert, les chromosomes en bleu et les kinétochores en rouge (Desai, 2000).

L'assemblage du fuseau mitotique est réalisé par la nucléation des microtubules à partir des centrosomes, les centres organisateurs des microtubules. Le centrosome est une structure composée de deux centrioles, permettant la nucléation du cytosquelette de microtubules en interphase. À l'entrée en mitose, le cytosquelette de microtubules se désassemble et le centrosome se duplique. Les deux centrosomes se séparent et se placent de chaque côté de la cellule établissant la bipolarité cellulaire. L'assemblage d'un fuseau mitotique bipolaire est nécessaire à une division cellulaire correcte. La formation d'un fuseau multipolaire, induit par la présence de centrosomes surnuméraires, peut conduire à la répartition inégale du matériel génétique générant alors des cellules aneuploïdes (ayant un nombre anormal de chromosomes), constituant la signature de nombreux cancers (Ganem et al., 2009; Kops et al., 2005; Kwon et al., 2008; Quintyne et al., 2005; Silkworth et al., 2009).

À la suite de la duplication, l'activité de nucléation des centrosomes augmente et chaque centrosome induit la polymérisation d'un réseau de microtubules (Prosser and Pelletier, 2017). Les microtubules sont alors dynamiquement instables. Leur extrémité (+) oscille entre l'élongation et le rétrécissement par l'ajout et la perte de sous-unités de tubuline. L'extrémité des microtubules se déplace ainsi sur plusieurs micromètres dans l'espace cellulaire pour « chercher » un chromosome. La capture

d'un chromosome stabilise l'extrémité (+) du microtubule et initie l'assemblage du fuseau mitotique. Ce modèle de « search-and-capture » formulé en 1986 par Kirschner et Mitchison est le mécanisme fondamental permettant l'assemblage du fuseau mitotique (Kirschner and Mitchison, 1986). D'autres éléments, tels que des gradients moléculaires, l'activité de protéines motrices et la géométrie cellulaire favorisent également l'assemblage du fuseau (Heald and Khodjakov, 2015; Prosser and Pelletier, 2017).

La formation complète et correcte du fuseau nécessite un attachement stable de tous les chromosomes par des microtubules provenant des pôles opposés ou attachement bipolaire. L'attachement de 20 à 30 microtubules kinétochoriens au niveau d'un kinétochore forme une structure stable appelée fibre-K (Rieder, 2005; Tolić, 2017). À la fin de la prométaphase, tous les chromosomes doivent être attachés par des fibres-K bi-orientées. Ce système de bi-orientation est régulé par le point de contrôle du fuseau mitotique ou Spindle Assembly Checkpoint (SAC) (Musacchio, 2015).

1.3 Le point de contrôle du fuseau mitotique

Le SAC est un mécanisme contrôlant l'ouverture de l'anneau de cohésine qui maintient ensemble les chromatides sœurs. Il prévient ainsi le déclenchement de l'anaphase tant que tous les kinétochores ne sont pas attachés de façon stable aux microtubules du fuseau, ce qui peut significativement allonger la durée de la mitose (Meraldi et al., 2004). Une entrée en anaphase prématurée, avant l'attachement bipolaire des chromosomes, peut conduire à la répartition inégale du matériel génétique causant des aneuploïdies (Sansregret and Swanton, 2017).

Les kinétochores non attachés forment dès la prométaphase, le mitotic checkpoint complex (MCC) composé des protéines Budding uninhibited by benzimidazole-related 1 (BubR1), Budding uninhibited by benzimidazole 3 homolog (Bub3), Mitotic arrest deficient 2 (Mad2) et Cell division cycle 20 (Cdc20). Le MCC se lie à l'anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) et inhibe son activité ubiquitine-ligase (Chao et al., 2012). Lorsque tous les chromosomes sont attachés et alignés à l'équateur de la cellule lors de la métaphase, le MCC se désassemble et

libère Cdc20 qui active alors APC/C. APC/C peut désormais dégrader ses cibles, la sécurine et la cycline-B1 (Pines, 2011). La dégradation de la sécurine libère la séparase, une enzyme qui clive la sous-unité kléisine de l'anneau de cohésine déclenchant ainsi la séparation des chromatides et donc le passage en anaphase (Hagting et al., 2002; Uhlmann, 2003; Uhlmann et al., 1999). Parallèlement, la dégradation de la cycline-B1 par APC/C inactive la cyclin-dépendente kinase 1 (Cdk1) induisant la sortie de la mitose (Glotzer et al., 1991; Sudakin et al., 1995). Au contraire, si certains kinétochores ne sont pas attachés, le SAC reste non-satisfait et l'inhibition de APC/C est maintenue. Les chromatides sœurs restent donc liées entre elles et le complexe cycline-B1/Cdk1 demeure actif empêchant ainsi la sortie de la mitose. (Lara-Gonzalez et al., 2012) (Figure 19).

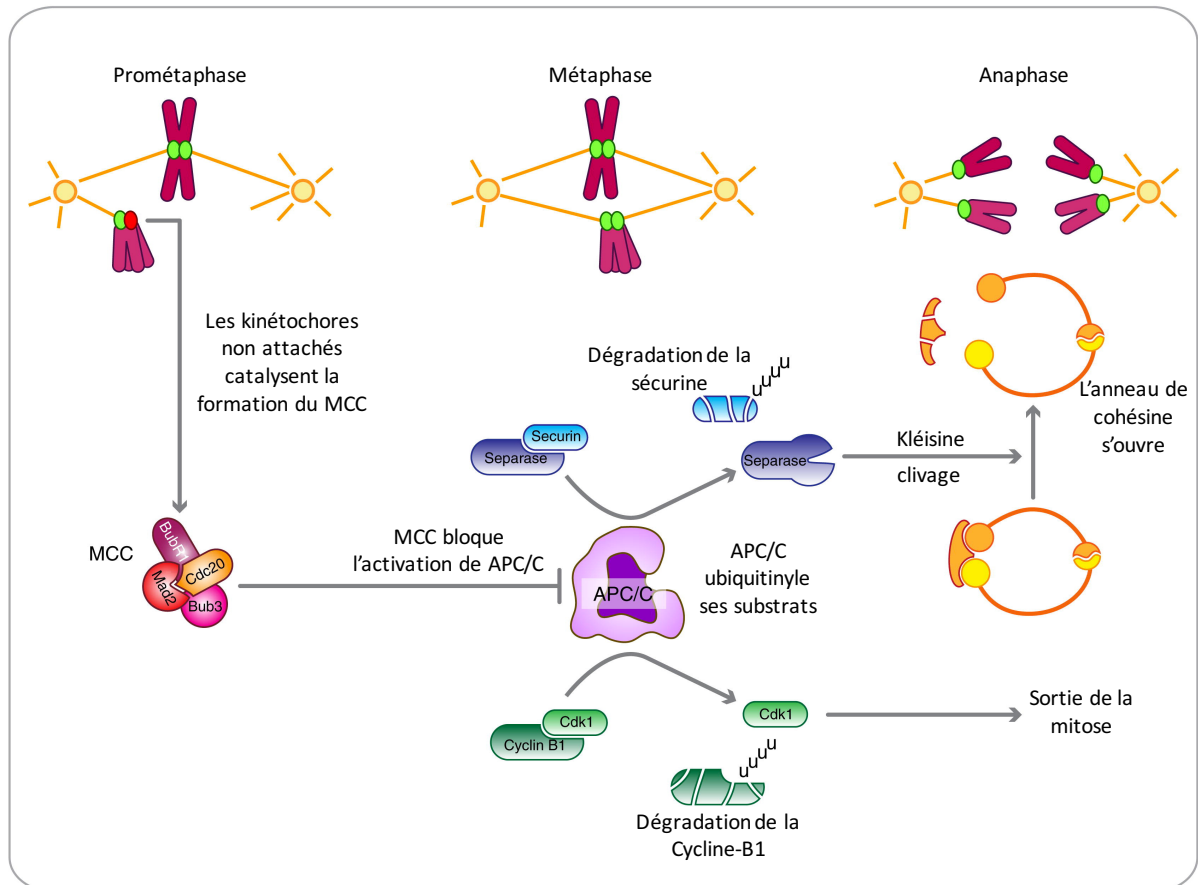


FIGURE 19 : LE MODE DE FONCTIONNEMENT DU POINT DE CONTRÔLE DU FUSEAU MITOTIQUE

(Lara-Gonzalez et al., 2012)

Le signal de non-attachement des kinétochores est un processus complexe mettant en jeu l'activation de nombreuses protéines (Foley and Kapoor, 2013; Musacchio and Salmon, 2007) dont la protéine Mad2 qui se localise au niveau des kinétochores et est systématiquement libérée après l'attachement du kinétochore au microtubule (Chen et al., 1998; Waters et al., 1998). Son interaction avec Mad1, au niveau du kinétochore, catalyse son changement de conformation lui permettant de s'associer à Cdc20 pour former le complexe MCC (De Antoni et al., 2005; Luo et al., 2000; Mapelli et al., 2007; Sironi et al., 2002). Lors de l'attachement d'un microtubule, Mad1 et Mad2 sont exclus du kinétochore *via* un mécanisme appelé « stripping » (Chen et al., 1996) dépendant notamment de la dynéine, protéine motrice associée aux microtubules (Howell et al., 2001; Maldonado and Kapoor, 2011).

Mais selon plusieurs travaux, l'attachement des kinétochores seul ne permettrait pas le passage du SAC. Celui-ci nécessiterait un second signal : la tension exercée sur les kinétochores (Maresca and Salmon, 2009; McIntosh, 1991; Nicklas et al., 1995; Uchida et al., 2009). L'étirement de la chromatine lors de l'attachement des microtubules augmente la distance et la tension entre les kinétochores des chromatides sœurs, ce qui stabiliserait l'attachement lui-même et favoriserait l'inactivation du SAC. Cependant ce mécanisme reste controversé (O'Connell et al., 2008; Pinsky and Biggins, 2005; Waters et al., 1998).

1.4 Les mécanismes de régulation du positionnement du fuseau mitotique

Une fois assemblé, le fuseau mitotique doit garder une architecture et une orientation stables lors de la métaphase. Dans les cellules adhérentes, comme les cellules HeLa, le fuseau mitotique est centré et aligné parallèlement au substrat. Des défauts d'orientation et de morphologie du fuseau peuvent induire des anomalies de la séparation du matériel génétique et ont été associés à différentes pathologies (Noatynska et al., 2012) telles que le cancer (Pease and Tirnauer, 2011; Quyn et al., 2010), la microcéphalie (Fish et al., 2006) ou les maladies neurodégénératives (Godin et al., 2010). De façon physiologique l'orientation du fuseau mitotique affecte la structure et la morphogénèse tissulaire (Nestor-Bergmann et al., 2014). Dans les épithéliums par exemple, l'alignement du fuseau parallèlement à la lame basale

permet la division symétrique des cellules et l'expansion du tissu le long de l'axe de division. L'alignement perpendiculaire du fuseau induit une division asymétrique et un épaissement du tissu perpendiculairement à l'axe de division (Baena-López et al., 2005; Morin and Bellaïche, 2011; Quesada-Hernández et al., 2010; Woolner and Papalopulu, 2012).

Le positionnement du fuseau mitotique est régulé par de nombreux facteurs biochimiques, mécaniques et géométriques (di Pietro et al., 2016). La forme de la cellule a été définie comme l'un des premiers déterminants importants. La règle de Hertwig, découverte par le zoologiste allemand Oskar Hertwig en 1884 (Hertwig, 1884) et validée depuis dans de nombreux tissus (Gibson et al., 2011; Minc and Piel, 2012; Minc et al., 2011; O'Connell and Wang, 2000), stipule que le fuseau mitotique a tendance à s'orienter le long du grand axe de la cellule, la division ayant lieu perpendiculairement à cet axe. La forme de la cellule au cours de la métaphase dépend à la fois des changements de volume liés à une augmentation de la pression osmotique et au remodelage du cytosquelette d'actine qui interagit physiquement avec le fuseau (Matthews et al., 2012; Zlotek-Zlotkiewicz et al., 2015).

Le fuseau mitotique possède des propriétés d'élasticité qui lui sont propres (Brangwynne et al., 2006; Gittes et al., 1993; Rubinstein et al., 2009) et génère des forces internes participant à sa stabilité (Dumont and Mitchison, 2009). La dynamique des microtubules, leur polymérisation et dépolymérisation, génère des forces permettant de pousser ou tirer des éléments comme les kinétochores (Dogterom and Yurke, 1997; Inoué and Salmon, 1995; Inoué and Sato, 1967; Mitchison and Kirschner, 1984; Skibbens et al., 1993). Les moteurs moléculaires des microtubules tels que la kinésine ou la dynéine, utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour « avancer » le long des microtubules et générer des forces de glissement entre les microtubules et d'autres structures (Sharp et al., 2000; Svoboda and Block, 1994).

L'interaction du fuseau mitotique avec le cortex d'actine nouvellement formé constitue un élément clé de l'équilibre mécanique nécessaire au bon positionnement du fuseau (Kunda and Baum, 2009).

2. La régulation du cytosquelette d'actine au cours de la mitose et son influence sur le fuseau mitotique

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur les cellules animales principalement dans des systèmes expérimentaux en 2D. Ces avancées ont permis de mieux comprendre comment la dynamique du cytosquelette d'actine au cours de la mitose influence la formation et le positionnement du fuseau mitotique et peut ainsi influencer le déroulement de la division cellulaire.

2.1 Le cortex d'actine et l'arrondissement de la cellule au cours de la prophase

Lors de la mitose, la plupart des cellules adhérentes *in vivo* et en culture changent drastiquement de forme. Ces modifications morphologiques sont induites par un remodelage important des adhérences et du cytosquelette d'actine qui forme alors un cortex à la périphérie cellulaire (Sanger, 1975) (Figure 20).

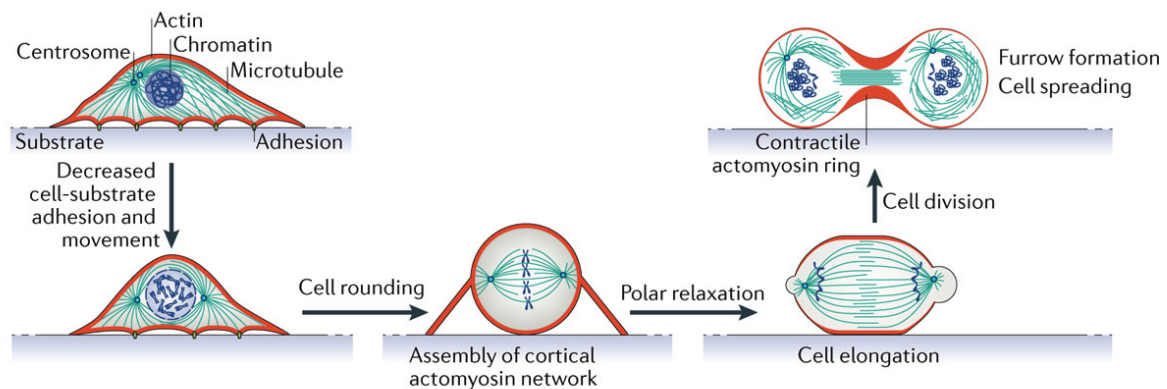


FIGURE 20 : LA DYNAMIQUE DE L'ACTINE AU COURS DE LA MITOSE

Lors de l'entrée en mitose, la cellule réduit l'adhérence avec son substrat, elle réorganise son cytosquelette d'actine sous la forme d'un cortex et prend une forme sphérique. À la fin de l'anaphase, le réseau d'actine se relâche au niveau des pôles et l'actine se concentre au centre de la cellule pour préparer la cytokinèse. L'actine forme alors un anneau contractile qui creuse le sillon de clivage entre les deux cellules filles (Ramkumar and Baum, 2016).

2.1.1 La formation du cortex d'actine

La cellule, étalée et aplatie en interphase, prend à l'entrée en mitose une forme presque sphérique, ce phénomène est appelé « arrondissement » ou « rounding » (Cramer and Mitchison, 1997; Harris, 1973; Sanger et al., 1984) et débute par la rétraction de la cellule qui se décroche de son substrat en quelques minutes (environ 5 à 20 minutes) (Dao et al., 2009). La majorité des protéines d'adhérence deviennent cytoplasmiques et certaines se relocalisent par la suite au niveau des structures mitotiques comme le fuseau mitotique (Herreros et al., 2000; Hirota et al., 2000; Suzuki and Takahashi, 2003; Yamakita et al., 1999). Certains sites d'adhérence résistent cependant au rounding et restent en contact avec le substrat formant de fins tubes de membrane enrichis en filaments d'actine appelés fibres de rétraction qui ancrent la cellule mitotique au substrat (Cramer and Mitchison, 1997; Taylor and Robbins, 1963). Dans le même temps, la pression osmotique intracellulaire augmente (Stewart et al., 2011a), les fibres de stress se désassemblent et l'actine se relocalise au niveau périphérique formant un cortex (Sanger et al., 1989; Théry and Bornens, 2006). La famille des protéines ezrine-radixine-moésine (ERM) ancre le cortex d'actine nouvellement formé à la membrane cellulaire (Bretscher et al., 2002) et la myosine-II s'intercale entre les filaments d'actine (Ramanathan et al., 2015).

La formation du cortex d'actine est initiée dès le début de la prophase et orchestrée par les acteurs de la voie de la petite protéine G RhoA. Il a été montré que la rétraction cellulaire initiale dépend notamment de l'activation de la voie RhoA par le GEF epithelial cell transforming 2 (Ect2) (Matthews et al., 2012) et de l'activation de la moésine par phosphorylation par la kinase SLIK (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). Ect2, présent dans le noyau, est libéré dans le cytoplasme lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Il est phosphorylé par le complexe cycline-B1/Cdk1 ce qui stimule son activité GEF (Gavet and Pines, 2010; Tatsumoto et al., 1999) et active RhoA au niveau de la membrane plasmique (Matthews et al., 2012; Niiya et al., 2006; Rosa et al., 2015). RhoA active ensuite ses effecteurs, dont la formine Diaphanous (Dia) qui va orchestrer la polymérisation d'un réseau rigide de filaments d'actine non branchés (Bovellan et al., 2014; Rosa et al., 2015) associé à la myosine-II (Ramanathan et al., 2015) ([Figure 21](#)).

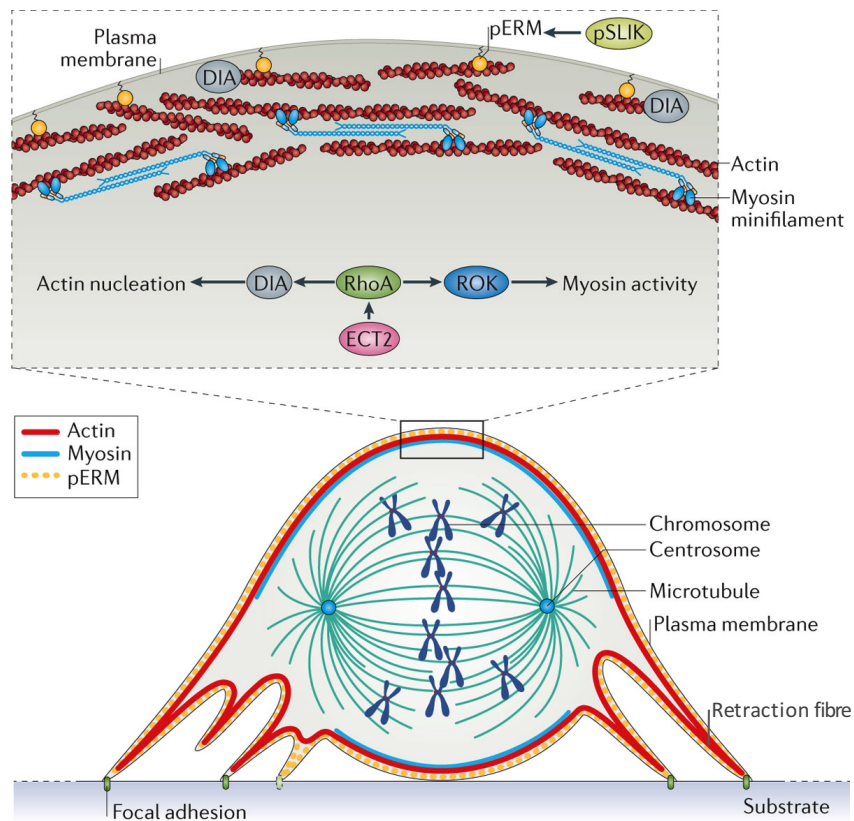


FIGURE 21 : LA FORMATION DU CORTEX D'ACTINE LORS DU ROUNDING

La libération de Ect2 dans le cytoplasme lui permet d'activer RhoA et ses cibles, ROCK et la formine Dia, induisant la formation d'un cortex d'acto-myosine contractile. La sterile-20 kinase phosphorylée (pSLIK), et donc active, va phosphoryler les protéines ERM (Carreno et al., 2008; Machicoane et al., 2014) qui ancrent le cortex d'acto-myosine à la membrane de la cellule (Ramkumar and Baum, 2016).

Le cortex d'acto-myosine en mitose est plus fin et plus rigide qu'en interphase et les forces de tension au sein du cortex sont plus importantes en mitose. La myosine-II participe à la régulation de la tension corticale en tirant sur les filaments d'actine créant une contraction (Mayer et al., 2010; Ramanathan et al., 2015; Tinevez et al., 2009). Mais l'architecture des filaments d'actine, indépendamment de la myosine, a été récemment identifiée comme un nouveau régulateur clé de cette tension corticale (Chugh et al., 2017). La perturbation des protéines régulant la longueur des filaments d'actine, comme la cofiline ou la formine Diaphanous homolog 1, modifie l'épaisseur du cortex et induit une diminution de la tension corticale. De plus, ce mécanisme est indépendant de l'attachement du cortex à la membrane par les protéines ERM. Une modélisation informatique mise au point par les auteurs suggère que les filaments

d'actine polymérisés lors de la mitose posséderaient une longueur intermédiaire permettant la génération d'une tension corticale maximale (Chugh et al., 2017).

Ce cortex d'actine nouvellement formé permet de créer l'espace nécessaire à la formation correcte du fuseau mitotique et joue un rôle dans son orientation et sa stabilisation.

2.1.2 Le cortex d'actine et la résistance au confinement

La formation du cortex d'acto-myosine à l'entrée en mitose est un moyen pour la cellule d'adopter la forme et la rigidité appropriées apportant ainsi l'équilibre mécanique nécessaire à l'assemblage du fuseau mitotique et à sa stabilité. Au sein d'un tissu par exemple, les cellules sont contraintes par leurs voisines et la MEC qu'elles doivent pousser pour s'assurer un espace suffisant pour se diviser. Dans ce cas, l'arrondissement à l'entrée en mitose revêt d'autant plus d'importance.

L'utilisation de dispositifs de confinement et de compression a permis de montrer que la modification morphologique mise en place par la cellule à l'entrée en mitose est cruciale pour la progression mitotique (Cadart et al., 2014). L'application de forces de confinement induit des défauts de l'assemblage du fuseau mitotique, notamment une proportion importante de fuseaux multipolaires, ainsi que des défauts d'orientation du fuseau mitotique. Cela entraîne des défauts de capture des chromosomes retardant significativement l'arrivée en anaphase. Ces anomalies ont pour conséquences majeures un ralentissement global de la progression mitotique et des divisions anormales se traduisant par la génération de plus de deux cellules filles et/ou par des aneuploïdies (Cattin et al., 2015; Desmaison et al., 2013; Dumont and Mitchison, 2009; Lancaster et al., 2013; Sorce et al., 2015; Tse et al., 2012).

L'arrondissement des cellules en mitose est dû à une augmentation croissante de la pression osmotique intracellulaire, causée notamment par l'activation de l'antiporteur Na^+/H^+ (Putney and Barber, 2003) ainsi que par la contraction du cortex d'acto-myosine (Stewart et al., 2011a). En effet, l'abolition de la contraction du cortex d'acto-myosine induit une réduction de la pression osmotique associée à une augmentation anormale du volume cellulaire (Boucrot and Kirchhausen, 2008).

La contraction du cortex d'acto-myosine produirait une tension corticale qui s'opposerait donc à la pression intracellulaire, permettant le maintien d'une forme et d'un volume cellulaires optimaux pour la suite de la mitose (Fischer-Friedrich et al., 2014; Ramanathan et al., 2015; Stewart et al., 2011a).

Cependant, le consensus n'est pas encore total sur l'implication de la myosine lors du rounding. Si de nombreux travaux ont montré que l'actine est impliquée dans ce processus (Cramer and Mitchison, 1997; Fujibuchi et al., 2005), les travaux sur les protéines ERM montrent que la myosine-II n'est pas nécessaire. L'activation de la moésine peut en effet à elle seule induire le rounding et la rigidification du cortex dans des cellules en interphase et cela même dans des cellules déficientes en myosine-II (Kunda et al., 2008). Des études plus récentes (Zlotek-Zlotkiewicz et al., 2015) nuancent également les résultats de Stewart et al. (Stewart et al., 2011a), en montrant que le volume cellulaire augmente transitoirement lors de la mitose et que l'augmentation de la pression intracellulaire lors du rounding ne dépend pas de la contraction du cortex d'acto-myosine.

Il est dans tous les cas admis que le rounding est dû à une augmentation de la pression osmotique intracellulaire. Les cellules utilisent probablement ce mécanisme original pour entrer en mitose car les forces produites par une augmentation de la pression osmotique sont très importantes. Une augmentation de l'osmolarité de 10% correspond à une force de 80 kPa pour une cellule de mammifère ayant une osmolarité d'environ 330 mOsm (Zlotek-Zlotkiewicz et al., 2015). La génération de ces forces de pression très importantes pourrait être suffisante à la réussite de l'arrondissement des cellules au sein d'environnements très confinés comme les tissus.

Si la contribution précise de la tension du cortex d'acto-myosine sur la pression exercée lors du rounding est encore débattue, elle est cependant indispensable au positionnement correct du fuseau mitotique dans des conditions de confinement (Lancaster et al., 2013; Sorce et al., 2015), *via* notamment l'établissement d'interactions physiques entre le cortex et les microtubules.

2.1.3 L'interaction cortex/fuseau

Les microtubules astraux occupent une position clé au sein du fuseau mitotique. Leur ancrage direct au cortex d'actine les soumet à des forces de traction et de friction permettant de diriger l'orientation du fuseau mitotique.

Les microtubules sont des structures polarisées possédant une extrémité (+) libre où des protéines appelées microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs) se fixent (Akhmanova and Hoogenraad, 2005). Ces +TIPs sont des régulatrices de la stabilité des microtubules et permettent également leur association avec différentes structures cellulaires dont le cortex d'actine en mitose. Dans les cellules adhérentes, plusieurs +TIPs sont impliquées dans l'ancrage des microtubules astraux au cortex dont les CLIP-associating proteins (Mimori-Kiyosue et al., 2005, 2006; Samora et al., 2011), la protéine end-binding 1 (EB1) (Luo et al., 2016; Ran et al., 2017) ou la dynéine (Dujardin and Vallee, 2002; Hendricks et al., 2012; O'Connell and Wang, 2000). Dans les cellules de mammifères en culture, le mécanisme impliquant la dynéine est à l'heure actuelle le mieux caractérisé.

La dynéine interagit avec le cortex par l'intermédiaire du module $G\alpha_i$ -LGN-NuMa situé dans la zone du cortex à l'interface avec les microtubules astraux. Ce module est composé de la protéine Leucine-Glycine-Asparagine repeat (LGN), de la protéine G hétérotrimérique $G\alpha_i$ et de la protéine Nuclear mitotic apparatus (NuMA). Le domaine C-terminal de LGN interagit avec $G\alpha_i$, ancrée à la membrane plasmique et le domaine N-terminal avec NuMA qui recrute la dynéine (Culurgioni et al., 2011; Du and Macara, 2004; Du et al., 2001; Kaushik et al., 2003). Le recrutement de la dynéine au cortex lui permet d'exercer des forces de traction sur les microtubules astraux pour contrôler le positionnement correct du fuseau mitotique dans la cellule (Busson et al., 1998; Kotak et al., 2012; Laan et al., 2012; Redemann et al., 2010) (Figure 22).

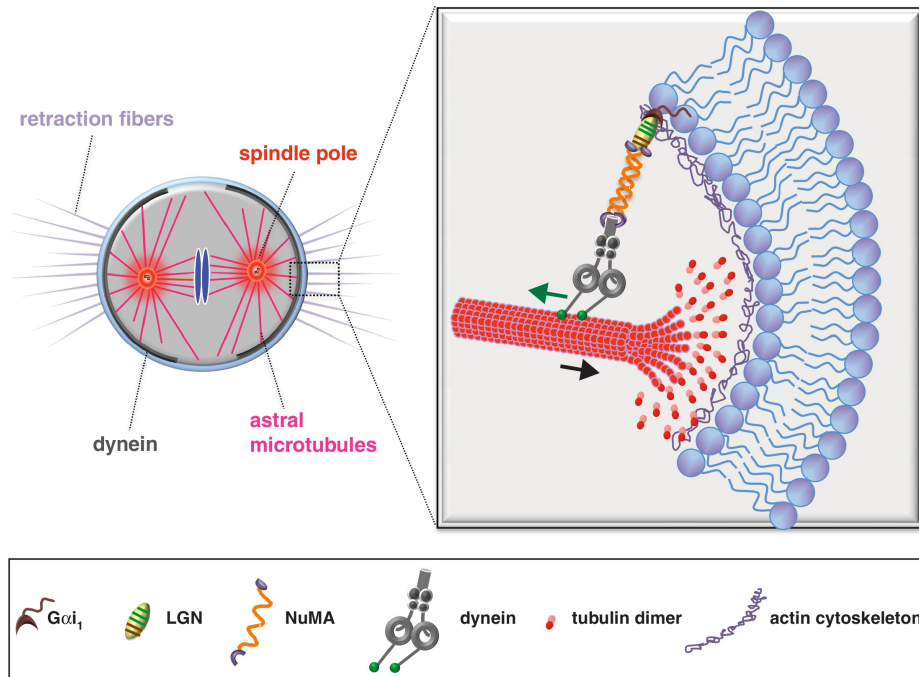


FIGURE 22 : L'ANCRAGE DU FUSEAU MITOTIQUE AU CORTEX PAR LA DYNÉINE ET LE COMPLEXE $G\alpha_i$ /LGN/NuMA

Le complexe $G\alpha_i$ /LGN/NuMA ancré sous la membrane plasmique recrute la dynéine, protéine motrice associée aux microtubules. Le déplacement de la dynéine vers l'extrémité (-) du microtubule (flèche verte) permettrait de générer des forces de traction sur les microtubules (flèche noire) pour stabiliser le fuseau mitotique. Outre son activité motrice, le maintien seul de l'ancrage des microtubules en dépolymérisation par la dynéine, permettrait également de produire les forces de traction nécessaires (Kotak and Gönczy, 2013).

De nombreux régulateurs de ce recrutement ont été décrits. Parmi eux on compte les microtubules astraux (Tame et al., 2014; Zheng et al., 2013), des kinases impliquées dans la localisation corticale du complexe LGN/NuMA : Cdk1 (Kotak et al., 2013), Abelson tyrosine-protein kinase 1 (Matsumura et al., 2012), Ste20-like kinase (SLK) (Machicoane et al., 2014) et LIM domain kinase 1 (LIMK1) (Kaji et al., 2008) ainsi que deux voies impliquant des GTPases :

- la GTPase *Cdc42* qui régule l'accumulation de la dynactine, partenaire de la dynéine, dans la zone du cortex à l'interface avec les microtubules astraux par deux voies distinctes : (i) en interagissant avec son effecteur p21-activated kinase 2 complexé avec le GEF β Pix (Mitsushima et al., 2009) et (ii) en favorisant l'accumulation du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate au cortex via l'activation de la phosphatidylinositol-3-OH kinase (Toyoshima et al., 2007).

- la *GTPase Ras-related nuclear (Ran)* fonctionnant de concert avec la polo-like kinase 1 (Plk1) de la façon suivante. D'une part, un gradient de Ran-GTP, dérivé des chromosomes, restreint la localisation du complexe LGN/NuMA au cortex et l'exclut de l'équateur de la cellule. D'autre part, l'activité de la Plk1 induit la dissociation de la dynéine du complexe LGN/NuMA lorsqu'un centrosome est trop proche du cortex, générant des forces de traction asymétriques au niveau des microtubules astraux du centrosome opposé. Le fonctionnement coopératif de ces deux mécanismes permet de centrer le fuseau mitotique et maintenir son orientation (Kiyomitsu and Cheeseman, 2012) (Figure 23).

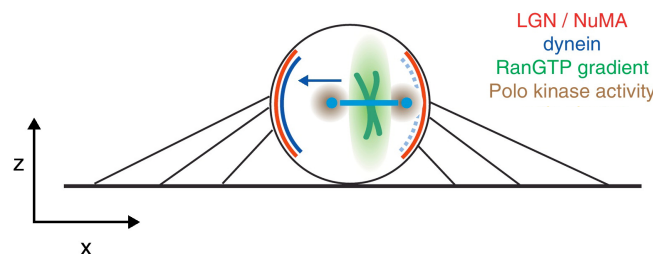


FIGURE 23 : LA RÉGULATION DU POSITIONNEMENT DU FUSEAU MITOTIQUE PAR LA DYNÉINE

Dans les cellules HeLa, l'orientation du fuseau mitotique (bleu clair) nécessite la génération de forces de traction par la dynéine (bleu foncé) recrutée au niveau du cortex par le complexe LGN/NuMA. La localisation de ce complexe au cortex est restreinte par un gradient de Ran-GTP (vert). Lorsqu'un centrosome est trop proche (à droite), l'activité de la Plk1 (gradient marron) élimine la dynéine du cortex (pointillés), induisant l'augmentation de la génération de forces à l'opposé (flèche bleue) ce qui recentre le fuseau mitotique (Stevermann and Liakopoulos, 2012).

D'autres travaux ont également montré qu'un large pool d'actine sous-corticale se forme lors du rounding (Fink et al., 2011; Mitsushima et al., 2010). Les fibres de rétraction semblent nécessaires à la polymérisation de ce « nuage » de filaments d'actine qui est particulièrement intense dans les régions du cytoplasme où la cellule est soumise à de fortes forces de tension (Fink et al., 2011). La myosine 10 non conventionnelle interagit directement avec les microtubules astraux et ce pool d'actine sous-corticale applique des forces sur le fuseau mitotique et l'oriente. Ce mécanisme est indépendant et fonctionne parallèlement à la voie impliquant la dynéine et le complexe LGN/NuMA (Kwon et al., 2015).

L'orientation du fuseau mitotique dépend donc en partie de l'ancrage des microtubules astraux au cortex d'actine. Ce mécanisme nécessite le maintien de l'intégrité du cortex et de sa tension mécanique.

2.1.4 L'organisation de l'actine et la tension corticale affectent le positionnement du fuseau mitotique

Les protéines ERM ancrent l'actine corticale à la membrane plasmique et participent à son organisation et à sa rigidification. Deux études publiées en 2008 ont mises en évidence leur rôle dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). En réponse à l'inactivation de la moésine, les cellules présentent des défauts de morphologie du fuseau mitotique qui apparaît souvent décentré et asymétrique avec une moitié courte et une plus longue. La microscopie en temps réel au cours de la métaphase révèle des oscillations et une perte totale de l'orientation du fuseau. Ces défauts induisent un mauvais alignement des chromosomes sur le plan équatorial affectant la ségrégation en anaphase et un retard global de la mitose (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). Ces mêmes défauts sont retrouvés à la suite de l'ajout de latrunculine B, un agent bloquant la polymérisation de l'actine (Kunda et al., 2008). De façon remarquable, les auteurs ont montré que la rigidification artificielle du cortex par l'ajout de concanavaline A, une lectine réticulant les glycoprotéines de la membrane plasmique, permet de restaurer la morphologie et l'orientation du fuseau mitotique dans des cellules déplétées pour la moésine (Kunda et al., 2008) ([Figure 24](#)). L'établissement d'un cortex rigide en métaphase par la moésine est donc indispensable au maintien de la stabilité du fuseau mitotique.

Les raisons principalement suggérées quant à la nécessité de la rigidification du cortex en mitose concernent la résistance aux forces. Comme il a été évoqué précédemment, les forces de pression engagées lors du rounding exigent une résistance importante de la membrane cellulaire. Dans le cas de l'orientation du fuseau mitotique, la dynéine exerce des forces de tension sur le cortex pour stabiliser le fuseau. Le cortex se rigidifie donc probablement lors de la mitose pour résister à ces tensions.

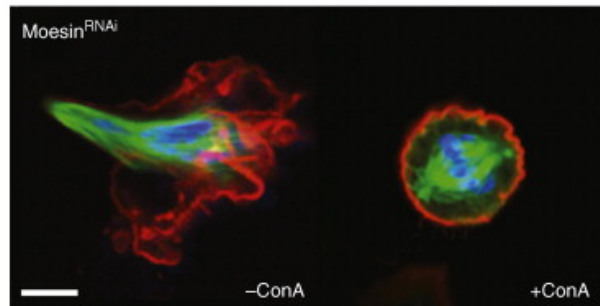


FIGURE 24 : LA RIGIDITÉ CORTICALE EST NÉCESSAIRE À LA MISE EN PLACE DU FUSEAU MITOTIQUE

Les cellules de drosophile SR^+ traitées avec un ARN interférent (RNAi), réduisant l'expression de la moésine, sont incapables de former un cortex rigide qui est totalement déformé par le fuseau mitotique dont l'organisation est fortement altérée (à gauche). Ce phénotype peut être restauré par l'ajout de la concanavaline A (ConA) dans le milieu de culture cellulaire (à droite). La restitution de la tension corticale est donc suffisante pour rétablir la morphologie et le positionnement du fuseau mitotique dans des cellules déplétées pour la moésine. Code couleur : actine-F en rouge, microtubules en vert et phospho-histone 3 en bleue. Barre d'échelle : 10 μm (Kunda and Baum, 2009; Kunda et al., 2008).

D'autres travaux corroborent ces résultats en donnant un autre exemple de perturbation du positionnement du fuseau mitotique en réponse à la déstabilisation mécanique du cortex. La LIMK1, dont l'activité augmente lors de la mitose, régule la dynamique de l'actine en phosphorylant et inactivant la cofiline, protéine provoquant la dépolymérisation des filaments d'actine (Amano et al., 2002). Les auteurs ont montré que l'inhibition de l'activité de la LIMK1 ou la suppression de son expression active la cofiline et induit sa localisation anormale au cortex lors de la métaphase. Cela entraîne une rupture du réseau d'actine corticale qui a pour conséquences des défauts de positionnement du fuseau mitotique et un retard global de la mitose. Des défauts similaires peuvent être induits par l'inhibition de la polymérisation de l'actine en utilisant la latrunculine A, un agent bloquant la polymérisation de l'actine (Kaji et al., 2008).

La voie SLK-moésine et la voie LIMK1-cofiline régulent toutes deux la stabilité du fuseau mitotique en favorisant respectivement la localisation de NuMA (Machicoane et al., 2014) et de LGN (Kaji et al., 2008) dans les zones du cortex faisant face aux pôles du fuseau. Un traitement à la latrunculine empêche dans les deux cas la localisation de LGN ou de NuMA au niveau du cortex, montrant que cette régulation nécessite l'intégrité et l'organisation du réseau d'actine corticale.

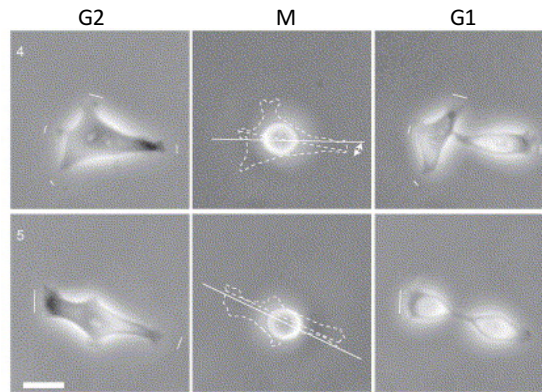
Une nouvelle protéine associée à l'actine, la Mitotic spindle positioning protein (MISP), a été identifiée comme potentiel linker entre les microtubules astraux et le cortex. MISP est localisée au niveau des fibres de rétraction et du cortex en mitose et interagit avec FAK, EB1 et la dynactine. Elle stabilise les microtubules astraux, favorise la localisation de la dynactine au cortex et régule l'orientation du fuseau mitotique et le passage du SAC (Maier et al., 2013; Nain and Cimini, 2013; Zhu et al., 2013). En interphase, MISP est impliquée dans l'organisation de l'actine-F mais sa fonction en mitose dans la structuration de l'actine reste à déterminer (Kumeta et al., 2014). Elle pourrait donc potentiellement jouer un rôle en mitose dans la stabilisation du fuseau dépendante de l'actine corticale.

Le maintien de l'orientation du fuseau mitotique dépend donc à la fois de l'organisation et de la tension corticale. Chez la levure bourgeonnante, il existe un point de contrôle activé en réponse à la perturbation du cytosquelette d'actine (Gachet et al., 2001; Lew, 2003; McMillan et al., 1998; Meadows and Millar, 2008; Tournier et al., 2004). Bien qu'un tel point de contrôle n'ait pas été mis en évidence chez les mammifères, la dynamique de l'actine *via* notamment son effet sur la stabilisation du fuseau est un élément clé dans la progression mitotique (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008).

Parallèlement à son arrondissement à l'entrée en mitose, la cellule conserve des sites d'adhérence avec son substrat, ou fibres de rétraction, qui influencent également le positionnement du fuseau mitotique *via* notamment la polarisation du cortex. La cellule est donc toujours soumise aux forces générées par le substrat en mitose.

2.2 La stabilisation du fuseau mitotique par les fibres de rétraction et les adhérences

Il a été observé que le fuseau mitotique a tendance à s'aligner sur l'axe le plus long de la cellule pré-mitotique (He et al., 2016; Hertwig, 1884; Minc et al., 2011; O'Connell and Wang, 2000; Théry and Bornens, 2006) et que lors de la cytokinèse, les cellules filles se ré-étalent selon l'empreinte des adhérences laissée par la cellule mère. La morphologie cellulaire en interphase « contient » donc des informations prédisposant la géométrie de la future division ([Figure 25](#)).



**FIGURE 25 : LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE ET LE MOTIF DES ADHÉRENCES EN INTERPHASE
CONDITIONNENT LA DIVISION CELLULAIRE**

Cellules observées au microscope à contraste de phase en temps réel. G2 : cellule mère en interphase 5 minutes avant le rounding. Les barres blanches marquent le contour de la cellule mère et ont été reportées en G1. M : les mêmes cellules en métaphase. Le contour de la cellule mère est indiqué par les pointillés blancs. L'axe le plus long de la cellule mère correspond au trait blanc en pointillés et l'axe de division cellulaire par le trait blanc plein. G1 : cellules filles 10 à 15 minutes après l'initiation de l'anaphase. Barre d'échelle : 30 μm (Théry and Bornens, 2006).

Les travaux de Michel Bornens et de son équipe ont mis en évidence que ce sont en partie les fibres de rétraction qui transfèrent la cartographie des adhérences sur la cellule en mitose sous la forme de marques corticales. Les auteurs ont suggéré que ces marques corticales définies par les adhérences en interphase permettent de guider l'orientation du fuseau mitotique et le ré-étalement lors de la cytokinèse (Théry et al., 2005, 2007). L'utilisation de micropatterns, substrats à forme variable permettant de fixer la géométrie des adhérences, leur a permis de montrer que la cortactine protéine régulant la polymérisation et l'organisation de l'actine corticale, ainsi que l'eitrine, protéine de la famille ERM, s'accumulent spécifiquement au niveau des fibres de rétraction au moment de l'arrondissement cellulaire. De plus, l'eitrine est enrichie au niveau des parties proximales des fibres (proches du corps cellulaire). Ces protéines sont également presque absentes des zones du cortex faisant face à la partie non adhérente de la cellule. Selon les auteurs, cette hétérogénéité de composition du cortex est indispensable pour le positionnement et la stabilisation du fuseau mitotique. En l'absence de cette hétérogénéité, le fuseau mitotique tourne de façon erratique dans la cellule pouvant conduire à des défauts de cytokinèse générant des cellules binucléées (Théry et al., 2005).

Des travaux plus récents montrent que la géométrie des adhérences contrôle l'orientation du fuseau mitotique mais de façon dynamique. Le fuseau adapte en effet continuellement son orientation à la distribution des fibres de rétraction (Fink et al., 2011). Pour le montrer, les auteurs ont réalisé une série d'expériences combinant différentes techniques de micromanipulation. Les cellules ont d'abord été ensemencées sur des micropatterns rectangulaires et cruciformes induisant l'alignement du fuseau mitotique dans l'axe le plus long du substrat. Un laser a ensuite été utilisé pour couper les fibres de rétraction alignées au niveau de l'axe le plus long. Les fuseaux mitotiques sur les substrats rectangulaires restent alors immobiles tandis que ceux sur les substrats en croix tournent pour s'aligner avec le nouvel axe d'adhérence le plus long (Figure 26).

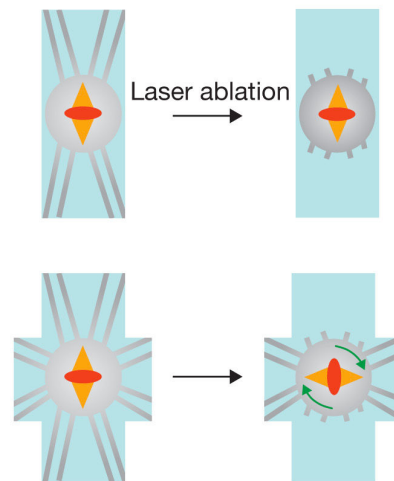


FIGURE 26 : LE FUSEAU MITOTIQUE SUIT DYNAMIQUEMENT LA DISTRIBUTION DES FIBRES DE RÉTRACTION

Sur le pattern rectangulaire, le fuseau mitotique reste immobile après l'ablation des fibres de rétraction. Sur le pattern cruciforme, le fuseau se réoriente dans l'alignement des fibres de rétraction restantes (flèches vertes) (Lancaster and Baum, 2011).

Les fibres de rétraction exercent des forces de tension puissantes sur le corps cellulaire et le substrat, ainsi l'ablation des fibres induit une nouvelle répartition de ces forces. Sur le substrat rectangulaire, aucune force ne résulte de l'ablation des fibres alors que sur le substrat cruciforme, les cellules se contractent au niveau des fibres de rétraction restantes, suggérant un rôle des forces exercées par les fibres de rétraction sur la réorientation du fuseau mitotique. Pour altérer la balance axiale des forces exercées par les fibres de rétraction les cellules ont été cultivées sur de fins anneaux

en silicone flexibles de forme elliptique, sur lesquels une force d'étirement ou stretch est appliquée. Les fuseaux mitotiques d'abord alignés dans l'axe le plus long de l'ellipse se réorientent alors dans la direction du stretch correspondant désormais à l'axe principal des forces (Figure 27).

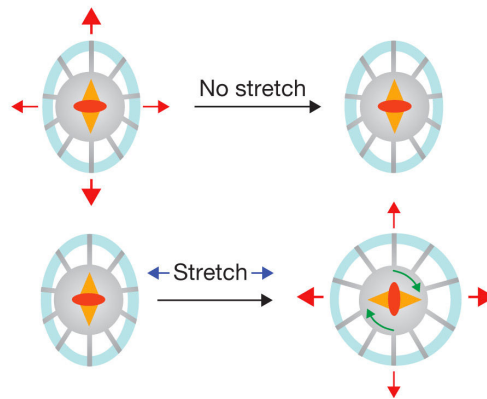


FIGURE 27 : LE FUSEAU MITOTIQUE SE RÉORIENTE DANS LA DIRECTION DES FORCES EXERCÉES SUR LA CELLULE

Pour altérer la distribution des forces les cellules ont été cultivées sur des substrats elliptiques flexibles (flèches rouges). Lorsqu'un stretch est appliqué (flèches bleues) induisant la transformation de l'ellipse en cercle, le fuseau mitotique se réaligne dans la direction du stretch. Pour les cellules contrôles non soumises au stretch, le fuseau mitotique reste immobile (Lancaster and Baum, 2011).

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer que les fibres de rétraction produisent des forces de tension nécessaires à l'alignement du fuseau mitotique en réponse à la géométrie des adhérences et aux forces extérieures exercées sur la cellule. Cependant, les processus moléculaires sous-jacents permettant la transmission des forces extérieures au sein de la cellule en mitose sont encore mal connus.

Il a été montré que des complexes focaux d'adhérence contenant la FAK et la paxilline subsistent au niveau des fibres de rétraction après le rounding et sont nécessaires pour orienter correctement le fuseau mitotique *in vitro* et *in vivo* en réponse aux forces de tension extérieures (Petridou and Skourides, 2014). Ces « adhérences focales mitotiques » ont également un rôle dans le contrôle de la symétrie du sillon de clivage lors de la cytokinèse (Taneja et al., 2016).

De la même façon que les adhérences focales en interphase, ces complexes d'adhérence pourraient directement transmettre les forces générées par l'environnement mécanique au cytosquelette d'actine.

Les intégrines, protéines d'ancrage de la cellule à sa MEC, sont également particulièrement impliquées dans le contrôle de la progression mitotique *in vivo* (Lechler and Fuchs, 2005) et *in vitro* (LaFlamme et al., 2008; Reverte et al., 2006; Toyoshima and Nishida, 2007). Dans des cellules HeLa cultivées sur un substrat recouvert de poly-L-lysine, polymère ne liant pas les intégrines, les fuseaux mitotiques ne sont plus orientés parallèlement au substrat et le même phénotype est retrouvé après l'ajout d'un anticorps bloquant l'intégrine $\beta 1$ (Toyoshima and Nishida, 2007). Dans une autre étude, l'induction d'une mutation rendant l'intégrine $\beta 1$ inactive empêche la formation d'un fuseau mitotique bipolaire perturbant ainsi le déroulement de la cytokinèse (Reverte et al., 2006). Deux modèles ont été proposés dans les cellules adhérentes en culture pour expliquer le mécanisme de régulation de l'orientation du fuseau mitotique par l'intégrine $\beta 1$, un modèle dépendant et un autre indépendant de l'adhérence avec le substrat :

- l'intégrine $\beta 1$ et l'intégrine-linked kinase (ILK) peuvent ancrer directement le complexe dynéine/dynactine au cortex indépendamment du complexe LGN/NuMA. Les intégrines interagiraient directement avec la MEC au niveau basal de la cellule pour ancrer le complexe indépendamment des fibres de rétraction afin de réguler l'orientation du fuseau mitotique (Morris et al., 2015) ([Figure 28](#)).

- l'intégrine $\beta 1$ est enrichie aux régions latérales du cortex et activée en réponse aux forces générées par les fibres de rétraction en l'absence de ligand. Cette activation force-dépendante et ligand-indépendante contrôle l'orientation du fuseau mitotique. De plus l'intégrine $\beta 1$ n'a aucune influence sur le lien cortex/microtubules asexiaux médié par le complexe LGN/NuMA, elle oriente en fait le fuseau *via* un mécanisme indépendant. L'activation de l'intégrine $\beta 1$ favorise la localisation et la phosphorylation au cortex des protéines d'adhérence Cas, Src et de la FAK. Ces trois protéines forment un complexe appelé « cortical mechanosensory complex » (CMC) crucial pour la bonne orientation du fuseau (Petridou and Skourides, 2016) ([Figure 29](#)).

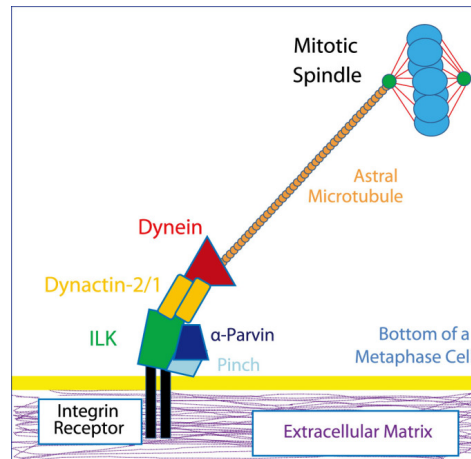


FIGURE 28 : MODÈLE D'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE VIA L'ANCRAGE DIRECT DES INTÉGRINES À LA MEC

Selon ce modèle les intégrines interagissent avec la MEC et ancrent le complexe dynéine/dynactine au niveau basal du cortex grâce au complexe IPP constitué de l'ILK, de la protéine Particularly Interesting New Cys-His (Pinch) et de l' α -Parvin (Legate et al., 2006). Le complexe intégrine $\beta 1$ /ILK/dynactine, analogue du complexe $G\alpha i$ /LGN/NuMA, recruterait ensuite la dynéine pour exercer des forces de tension sur le fuseau mitotique afin de l'aligner parallèlement au substrat (Morris et al., 2015).

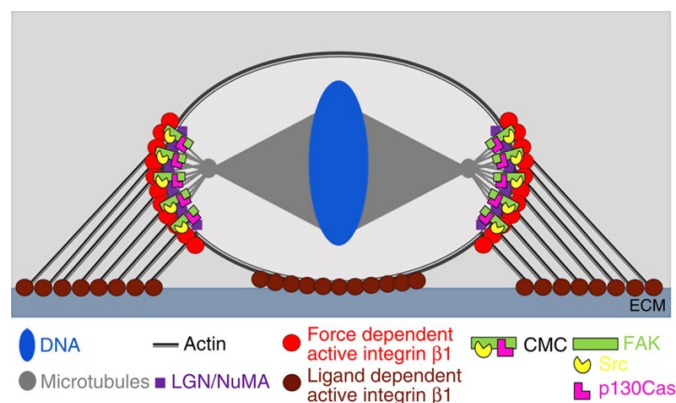


FIGURE 29 : MODÈLE D'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE VIA L'ACTIVATION DES INTÉGRINES DÉPENDANTE DES FORCES

Ce modèle suggère l'existence de deux pools d'intégrines actives dans la cellule mitotique : un pool à l'interface avec l'ECM dépendant des forces et du ligand (rouge foncé) et un pool aux régions latérales du cortex dans le prolongement des fibres de rétraction dépendant des forces et indépendant du ligand (rouge clair). Le pool ligand-dépendant serait essentiel pour l'adhérence mais non impliqué dans l'orientation du fuseau mitotique, tandis que le pool ligand-indépendant serait nécessaire pour le positionnement correct du fuseau mitotique en réponse aux forces extérieures via l'établissement du CMC (Petridou and Skourides, 2016).

2.3 Le remodelage du cortex en anaphase

Le second bouleversement de l'organisation du cytosquelette d'actine survient juste avant la cytokinèse. La machinerie cellulaire pilotant l'assemblage du cortex d'acto-myosine lors du rounding va alors générer un anneau d'acto-myosine contractile permettant la séparation des deux cellules filles. La rapidité avec laquelle la cellule met en place ces mécanismes requiert une coopération importante entre le cortex et le fuseau mitotique qui participe également à la mise en place du sillon de clivage entre les cellules filles.

Le fuseau mitotique se réorganise à l'entrée en anaphase, les microtubules astraux s'allongent et les microtubules kinétochoriens se raccourcissent entraînant les chromatides sœurs vers les pôles opposés de la cellule. Les extrémités des microtubules interpolaire, qui se superposent au centre de la cellule, sont empaquetées par des protéines motrices et des protéines associées aux microtubules formant le fuseau central. La formation et la position du sillon de clivage lors de la cytokinèse sont régulées par ce fuseau central (Glotzer, 2009), ainsi que par les microtubules astraux (Bringmann and Hyman, 2005; Werner et al., 2007). La régulation de la cytokinèse dépend donc de mécanismes complexes impliquant un très grand nombre de protéines (Barr and Gruneberg, 2007; Fededa and Gerlich, 2012; Pollard, 2017). Ici seront uniquement décrits les événements majeurs menant à la formation de l'anneau d'acto-myosine contractile.

Deux complexes sont principalement à l'origine de l'initiation de la formation de l'anneau dès l'anaphase : (i) le complexe centralspindlin composé de la mitotic kinesin-like protein 1 et de la Male germ cell Rac GTPase activating protein (MgcRacGAP) (White and Glotzer, 2012) et (ii) le Chromosomal passenger complex (CPC) constitué de la kinase Aurora B et de ses trois protéines régulatrices (Carmena et al., 2012; Kaitna et al., 2000; Romano et al., 2003). Suite à la diminution de l'activité du complexe cycline-B1/cyclin-dependent kinase 1 au début de l'anaphase, le CPC est relocalisé au centre du fuseau mitotique (Gruneberg et al., 2004; Hümmel and Mayer, 2009; Kitagawa et al., 2014; Mishima et al., 2004; Murata-Hori and Wang, 2002). Le CPC recrute le complexe centralspindlin ce qui favorise la localisation de RhoA et Ect2 au centre du fuseau (Bement et al., 2005; Douglas et al., 2010; Nishimura and Yonemura, 2006; Petronczki et al., 2007; Su et al., 2011; Yüce et al., 2005).

De plus, Aurora B phosphoryle MgcRacGAP, ce qui inhibe l'activité de la GTPase Rac (Canman et al., 2008) et elle stoppe sa régulation inhibitrice de GEF-H1 désormais déphosphorylé (Birkenfeld et al., 2007). Cela permet d'une part l'activation de RhoA par ses GEF, Ect2 et GEF-H1, induisant la formation de filaments d'actine parallèles (Castrillon and Wasserman, 1994; Severson et al., 2002; Watanabe et al., 2008), et d'autre part l'inactivation de Rac empêchant ainsi la formation d'un réseau branché d'actine (Canman et al., 2008). Ces deux mécanismes agissent donc parallèlement pour assembler l'anneau contractile. Aurora B favorise également la liaison de la myosin-II aux filaments d'actine (Ozlu et al., 2010; Uehara et al., 2010; Werner et al., 2007). Au réseau d'acto-myosine composant l'anneau s'ajoutent des septines, protéines s'organisant en filaments (Finger, 2002; Neufeld and Rubin, 1994) et l'anilline, une protéine liant les trois types de filaments entre eux pour structurer l'anneau (Maddox et al., 2007; Piekny and Glotzer, 2008; Piekny and Maddox, 2010) (Figure 30).

Cependant, la formation de l'anneau d'acto-myosine n'est pas uniquement le fruit d'une activation locale de voies de signalisation. Il a été montré qu'un flux d'actine et de myosine-II vers l'équateur du fuseau contribue également à la formation de l'anneau contractile (Cao and Wang, 1990; DeBiasio et al., 1996; Levayer and Lecuit, 2012; Wang et al., 1994; Zhou and Wang, 2008). Ce flux appelé « flux cortical » permettrait la relocalisation de filaments d'actine et de myosine préexistants au cortex vers l'équateur du fuseau et favoriserait leur réorganisation pour former l'anneau (Murthy and Wadsworth, 2005; Uehara et al., 2010).

La contraction de l'anneau est ensuite induite par la phosphorylation de la myosine-II par ROCK (Chircop, 2014; Kosako et al., 2000; Matsumura, 2005; Reichl et al., 2008). Cela creuse le sillon de clivage entre les deux cellules filles et crée un pont intercellulaire cytoplasmique entre elles. L'actine permet de stabiliser ce pont intercellulaire (Kouranti et al., 2006; Steigemann et al., 2009) afin d'éviter que les deux cellules filles ne re-fusionnent. Il est ensuite primordial que l'actine quitte le pont afin que l'abscission ait lieu (moment où les deux cellules filles sont définitivement séparées) (Dambournet et al., 2011; Fujiwara et al., 1978).

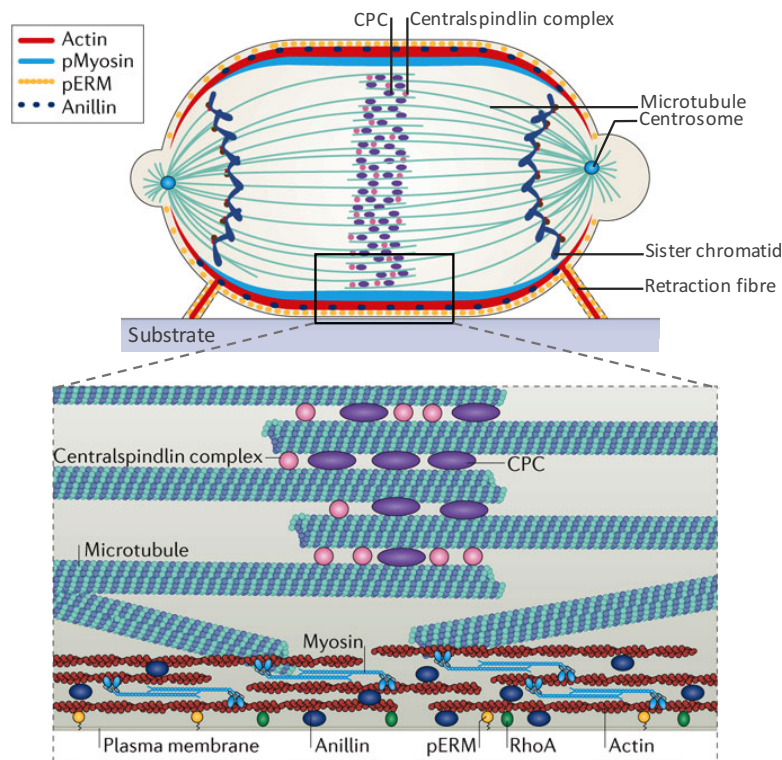


FIGURE 30 : L'INITIATION DE LA FORMATION DE L'ANNEAU CONTRACTILE EN ANAPHASE

Alors que les chromatides sœurs se séparent, le CPC et le complexe centralspindlin se déplacent vers l'équateur du fuseau mitotique. Ils recrutent RhoA et ses GEF initiant la formation d'un anneau contractile d'acto-myosine ancré à la membrane par les protéines ERM (Roubinet et al., 2011) et structuré par l'anilline (schéma de Ramkumar and Baum, 2016).

Néanmoins, selon certains travaux la constriction de l'anneau central d'acto-myosine n'est pas suffisante pour la réussite de la cytokinèse (Roubinet et al., 2012). Une redistribution des forces générées par le cortex d'acto-myosine est également nécessaire. Elle se traduit par l'établissement d'un gradient de contractilité corticale à travers la cellule, de telle sorte que le cortex soit plus contractile au centre et plus compliant aux pôles. Ce processus appelé « relaxation polaire » est principalement contrôlé par la déphosphorylation locale des protéines ERM au niveau des pôles (Kunda et al., 2012; Roubinet et al., 2011) et peut induire la formation de protrusions de la membrane ou « blebs » au niveau des pôles (Figure 30).

Ces blebs se forment lorsque l'énergie de liaison entre le cytosquelette d'actine et les lipides de la membrane n'est pas suffisante. La membrane se détache alors du cortex d'acto-myosine sous-jacent (Charras et al., 2005). Lors de leur formation, les

blebs sont dépourvus d'actine suggérant un assouplissement transitoire et local du cortex (Rankin and Wordeman, 2010; Roubinet et al., 2011). Ces blebs faciliteraient donc la dissipation de la pression intracellulaire excessive générée par la contractilité globale du cortex d'acto-myosine, assurant ainsi la stabilité du positionnement du sillon de clivage (Sedzinski et al., 2011; Tinevez et al., 2009). La formation de ces blebs ne serait cependant pas systématique et dépendrait notamment du type cellulaire (Matzke et al., 2001; Roubinet et al., 2012).

La mitose : réorganisation mécanique de la cellule

En résumé

- La **mitose** est la **division asexuée** des organismes eucaryotes au cours de laquelle **une cellule mère** donne naissance à **deux cellules filles** possédant chacune un **matériel génétique identique** à celui de la cellule mère. Elle est constituée de phases successives : la **prophase**, la **prométaphase**, la **métaphase**, l'**anaphase** et la **télophase**, suivies de la **cytokinèse**, séparation finale des deux cellules filles.
- Le **point de contrôle du fuseau mitotique** prévient le déclenchement de l'anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas attachés de façon bipolaire aux microtubules du fuseau mitotique, assurant ainsi une répartition équitable du matériel génétique.
- L'**arrondissement de la cellule** à l'entrée en mitose, dépend de changements de volume liés à une augmentation de la pression osmotique et au **remodelage du cytosquelette d'actine**, *via* l'activation de la voie de la **GTPase RhoA**. Celui-ci s'organise sous la forme d'un **cortex** fin et rigide qui **interagit physiquement avec le fuseau mitotique**.
- Le **maintien de l'orientation du fuseau mitotique** est crucial pour une division correcte. Il est régulé par des forces de tension générées grâce à l'interaction du fuseau avec le **cortex d'actine** *via* le **complexe dynéine/Gai/LGN/NuMA**. Il dépend également de l'**organisation du cortex d'actine** et de sa **tension**.
- Les **fibres de rétraction** et les d'adhérences comme l'**intégrine $\beta 1$** et la **FAK**, contrôlent la **réorientation du fuseau mitotique** en réponse aux **forces extérieures** exercées sur la cellule.

III. La protéine SUN2

1. Sa structure

1.1 À travers les espèces

Les protéines Sad1/UNC-84 (SUN) sont des protéines dont l'acronyme reflète leur forte conservation au cours de l'évolution. Le domaine SUN (Sad1 et UNC-84) qui les caractérise est un motif d'environ 175 acides aminés, d'abord identifié comme un motif commun présent au niveau du domaine C-terminal des protéines UNC-84 et Sad1 (Malone et al., 1999; Worman and Gundersen, 2006). La protéine Sad1, caractérisée en 1995 chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* est associée au « spindle pole body », l'équivalent du centrosome chez la levure et est impliquée dans la formation du fuseau mitotique (Hagan and Yanagida, 1995). La protéine UNC-84 caractérisée en 1999 par Malone et al., chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, est une protéine de l'enveloppe nucléaire nécessaire à l'ancrage du noyau lors du développement (Malone et al., 1999). C'est en comparant leurs séquences sur des bases de données bio-informatiques que Malone et al., identifient le domaine SUN comme un motif partagé par les deux protéines. Par des analyses prédictives à partir de banques d'ADN complémentaires de cerveau humain, ils découvrent de potentielles protéines possédant le même domaine chez les mammifères qu'ils nomment SUN1 et SUN2. Un peu plus tard, UNC-84A ou SUN1 et UNC-84B ou SUN2 sont mises en évidence chez les mammifères dans un criblage protéomique réalisé sur des enveloppes nucléaires extraites à partir de foies de rat et de souris (Schirmer et al., 2003). D'autres protéines à domaine SUN ont également été identifiées chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* (Jaspersen et al., 2002) et la drosophile (Kracklauer et al., 2007, 2010) ([Tableau II](#)). Les protéines à domaine SUN sont également présentes chez les végétaux dont *Arabidopsis thaliana*, *Vitis Vinifera* ou *Zea mays* (Graumann et al., 2010) et chez le protozoaire *Dictyostelium discoideum* (Shimada et al., 2010).

À l'heure actuelle, cinq protéines SUN ont été identifiées chez les mammifères : SUN1, SUN2, SUN3, SUN4 (ou SPAG4 pour Sperm Associated Antigen 4) et SUN5 (ou SPAG4L pour SPAG4-Like). Seules SUN1 et SUN2 (Crisp et al., 2006; Hodzic et al., 2004) sont ubiquitaires, SUN3 (Crisp et al., 2006; Göb et al., 2010), SUN4 (Shao

et al., 1999; Tarnasky et al., 1998) et SUN5 (Frohnert et al., 2011) sont exprimées de façon plus restreinte, majoritairement dans la lignée germinale mâle. Comme dans les autres espèces, ces protéines SUN possèdent en plus du domaine SUN, des superhélices ou domaines coiled-coil et au moins un domaine transmembranaire leur permettant d'être ancrées dans la membrane nucléaire interne.

TABLEAU II : Les protéines à domaine SUN sont conservées au cours de l'évolution

Les protéines à domaine SUN sont retrouvées chez différents organismes eucaryotes de l'Homme (*Homo sapiens*) aux levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*) en passant par la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et le nématode (*Caenorhabditis elegans*). Les noms alternatifs des protéines sont donnés entre parenthèses (d'après Rothballer and Kutay, 2012).

	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
SUN domain proteins	SUN1 (UNC84A)	Klaroid CG18584	UNC-84	Sad1 SPBC12D12.01	Mps3 (Nep98)
	SUN2 (UNC84B, Rab51P)	Giacomo CG6589	SUN-1 (Matefin)		
	SUN3 (SUNC1)				
	SPAG4 (SUN4)				
	SUN5 (SPAG4L, TSARG4)				

1.2 Structure protéique

Les protéines SUN sont des protéines transmembranaires de type II ancrées dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. L'enveloppe nucléaire sépare le noyau du cytoplasme et est constituée de deux membranes lipidiques délimitant un espace périnucléaire de 40 à 50 nm (Franke et al., 1981): la membrane nucléaire interne et la membrane nucléaire externe en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux. L'extrémité C-terminale des protéines SUN s'étend dans l'espace périnucléaire et l'extrémité N-terminale dans le nucléoplasme (Crisp et al., 2006) (Figure 31).

La protéine SUN2, caractérisée dans des cellules humaines HeLa en 2004 par Hodzic *et al.*, est une protéine de 717 acides aminés encodée par le gène *SUN2* ayant un poids moléculaire moyen de 85 kDa (Hodzic et al., 2004). En 2012, la structure tridimensionnelle de son domaine SUN est caractérisée par cristallographie (Sosa et al., 2012; Zhou et al., 2012).

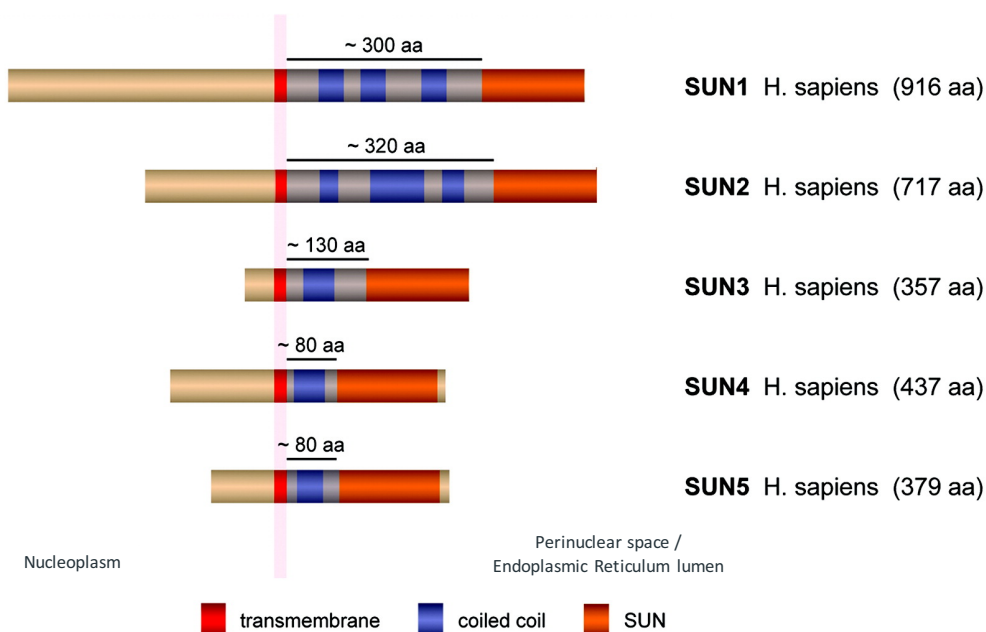


FIGURE 31 : LA STRUCTURE DES PROTÉINES SUN CHEZ L'HOMME

Les cinq isoformes humaines des protéines SUN (SUN1 à SUN5) sont ancrées dans la membrane nucléaire interne par au moins un domaine transmembranaire (rouge). Leur extrémité N-terminale s'étend dans le nucléoplasme (beige) et leur extrémité C-terminale dans l'espace périnucléaire ou dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux. Cette extrémité porte des superhélices ou domaines coiled-coil (bleu) et le domaine SUN (orange). L'indication des domaines coiled-coil se base sur des prédictions bio-informatiques (TMHMM2, parcoil2, prosite), il est possible que toute la région luminale précédant le domaine SUN soit une seule région coiled-coil continue (portion bleu-grise dont la longueur est indiquée en acides aminés) (d'après Rothballer et al., 2013).

Le domaine SUN est porté par l'extrémité C-terminale de SUN2 et se compose d'un sandwich compact de feuillets β antiparallèles au sein duquel plusieurs structures ont été identifiées : (i) une épingle à cheveux β de 20 acides aminés (résidus 567 à 587) appelée « KASH-lid », permettant l'interaction avec des protéines à domaine Klarsicht, ANC-1 et Syne Homology (KASH) (ii) une boucle cationique (résidus 593 à 601) formant une poche de liaison pour un cation très probablement un ion potassium (iii) un pont disulfure entre des cystéines conservées aux positions 601 et 705 qui permet notamment l'arrangement de la boucle cationique (iv) un site de glycosylation en position 636 (Figure 32a). En amont du domaine SUN, se trouve une région en « tige » correspondant à une hélice α (résidus 525 à 540). L'enroulement de cette hélice α avec les hélices α de deux autres protomères forme une superhélice ou région coiled-coil, qui permet la trimérisation de la protéine (Figure 32b). Chaque protomère

étant identique, SUN2 est une protéine homotrimérique. Lorsque SUN2 est sous forme trimérique, les trois domaines SUN forment une région en forme de feuille de trèfle (**Figure 32c**). Mais SUN2 n'existe pas uniquement sous forme d'homotrimère, elle est également présente sous forme de monomère (Zhou et al., 2012), d'homodimères et peut former des hétérodimères avec SUN1 (Lu et al., 2008; Wang et al., 2006). Au niveau de son extrémité N-terminale, SUN2 possède un site de liaison pour les lamines (Haque et al., 2010), protéines formant la lamina nucléaire, réseau de filaments intermédiaires composant principalement le nucléosquelette (Aebi et al., 1986; Gruenbaum et al., 2005) ; ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire lui permettant d'être importée dans la membrane nucléaire interne (Turgay et al., 2010).

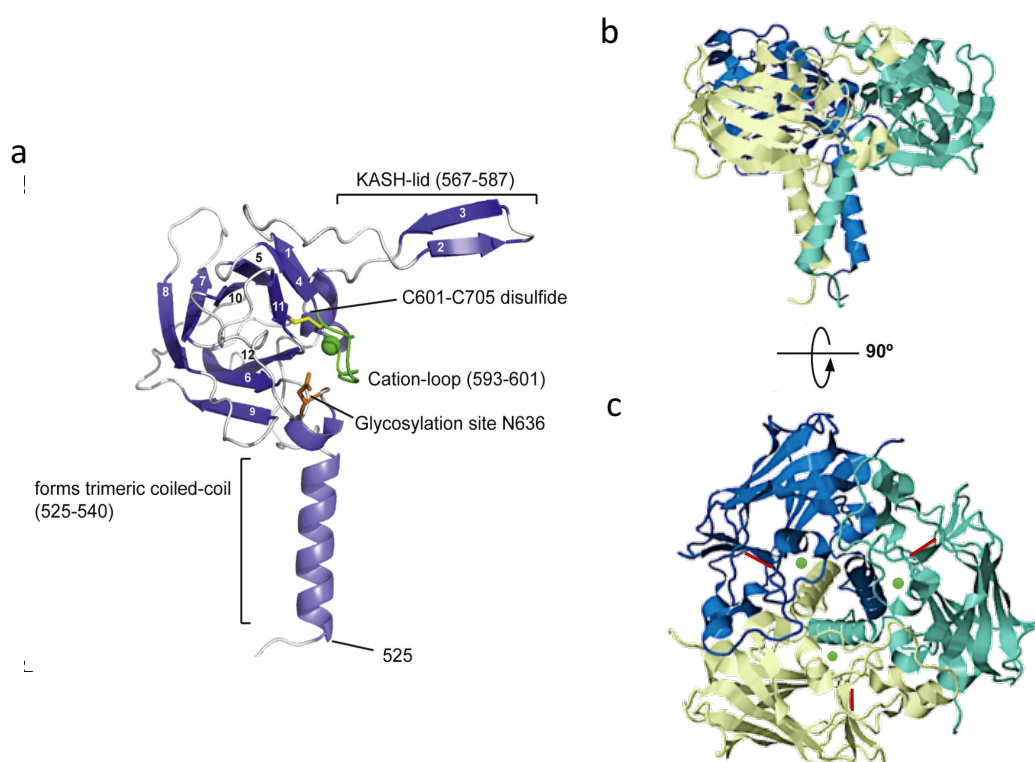


FIGURE 32 : LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU DOMAINE SUN DE LA PROTÉINE SUN2

a. Protomère de SUN2₅₂₂₋₇₁₇ constitué d'une hélice α (525-540) et du domaine SUN formé d'un cœur de feuillets β antiparallèles décoré par différentes structures : le KASH-lid (567-587), un pont disulfure (jaune) entre des cystéines aux positions 601 et 705, une boucle cationique (vert) formant une poche de liaison pour un cation (boule verte) et un site de glycosylation en position 636 (orange) (Sosa et al., 2012). b. Vue de côté d'un trimère de SUN2₅₂₂₋₇₁₇ en représentation « cartoon ». Chaque protomère est coloré différemment c. Vue du dessus du trimère de SUN2₅₂₂₋₇₁₇ après une rotation de 90° autour d'un axe horizontal par rapport à la vue précédente. Les protomères sont liés par leurs ponts disulfures en rouge. Les ronds verts représentent les cations (Sosa et al., 2012).

Grâce à son domaine SUN, SUN2 peut lier des protéines à domaine KASH dans l'espace périnucléaire, cette interaction forme un complexe, appelé « Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton » (LINC).

1.3 SUN2 au cœur du complexe LINC

Le complexe LINC est composé des protéines à domaine KASH ancrées dans la membrane nucléaire externe et liées au cytosquelette par leur extrémité cytoplasmique (Taranum et al., 2012a; Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002) et des protéines SUN ancrées dans la membrane nucléaire interne et liées aux lamines par leur extrémité nucléoplasmique (Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006; Hodzic et al., 2004).

Les protéines à domaine KASH sont au nombre de six chez les vertébrés : les Nuclear Envelope SPectrin Repeat ProteiNS (nesprines) de la nesprine-1 à la nesprine-4, la protéine KASH5 et la Lymphoid Restricted Membrane protein (LRMP) (Lindeman and Pelegri, 2012; Noegel and Neumann, 2011; Rothballer and Kutay, 2013; Zhang et al., 2001). Les nesprines-1, 2 et 3 sont exprimées de façon ubiquitaire, la nesprine-4 est spécifique des cellules épithéliales, KASH5 est seulement exprimée lors de la méiose (Morimoto et al., 2012) et LRMP est restreinte à la lignée lymphoïde (Behrens et al., 1994; Lindeman and Pelegri, 2012). Historiquement, les nesprines sont les premières protéines à domaine KASH à avoir été décrites comme des composants du LINC complexe (Crisp et al., 2006). Chez les vertébrés, quatre gènes *SYNE1* à *SYNE4* codant pour quatre nesprines (aussi appelées Syne, Myne ou NUANCE), de la nesprine-1 à la nesprine-4 ont été identifiés à l'heure actuelle (Cartwright and Karakesisoglou, 2014; Mellad et al., 2011; Rajgor and Shanahan, 2013). Ces quatre nesprines sont ancrées dans la membrane nucléaire externe lorsqu'elles sont impliquées dans le complexe LINC, mais elles possèdent plusieurs isoformes issues d'épissages alternatifs dont certaines comme la nesprine-1 α et la nesprin-2 α sont localisées dans la membrane nucléaire interne, où elles interagissent directement avec les lamines, l'émerine et les protéines SUN (Haque et al., 2010; Libotte et al., 2005; Mislou et al., 2002; Wheeler et al., 2007; Zhang et al., 2005). La diversité des partenaires des nesprines dans le cytoplasme permet au complexe LINC d'être en lien avec les trois structures composant le cytosquelette.

La nesprine-1 et la nesprine-2 lient l'actine-F (Padmakumar et al., 2004; Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002) et des protéines motrices des microtubules telles que la kinésine et la dynéine (Yu et al., 2011; Zhang et al., 2009). La nesprine-3 interagit avec la plectine qui lie les filaments intermédiaires (Ketema et al., 2007, 2013; Postel et al., 2011; Wilhelmsen et al., 2005) et la nesprine-4 interagit avec les microtubules via la kinésine (Roux et al., 2009) (Figure 33).

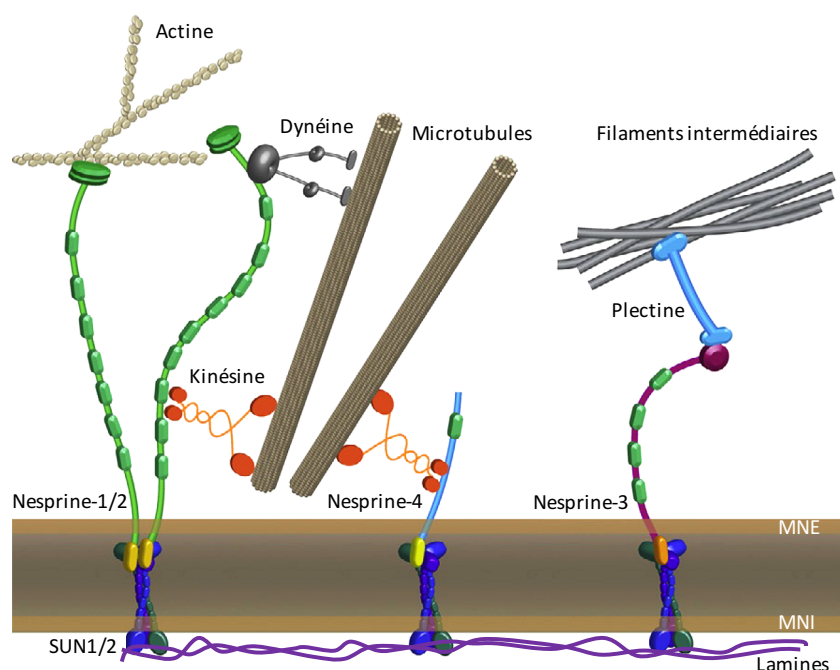


FIGURE 33 : LA DIVERSITÉ D'ORGANISATION DU COMPLEXE LINC

Le LINC est composé des nesprines ancrées dans la membrane nucléaire externe (MNE) et des protéines SUN ancrées dans la membrane nucléaire interne (MNI), interagissant avec les lamines dans le nucléoplasme. Les différentes isoformes des nesprines interagissent avec différents composants du cytosquelette : les nesprines 1 et 2 lient l'actine et les microtubules via la dynéine et la kinésine, la nesprine-3 lie les filaments intermédiaires via la plectine et la nesprine-4 interagit avec les microtubules via la kinésine (d'après Horn, 2014).

L'interaction directe entre les protéines SUN et les nesprines dans l'espace périnucléaire a été mise en évidence pour la première fois en 2005 par Padmakumar *et al.* (Padmakumar et al., 2005). Un an plus tard, Didier Hodzic et son équipe montrent que la localisation de la nesprine-2 Giant ou nesprine-2G (une isoforme de la nesprine-2) dans la membrane nucléaire externe, dépend de son interaction avec SUN1 et SUN2 et nomment cette structure formant un pont entre le cytosquelette et le nucléosquelette « Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton » (Crisp et al., 2006).

Par la suite, la cristallisation du domaine SUN par Sosa *et al.*, a permis de montrer que le complexe LINC est un hétérohexamère formé par l'interaction de trois domaines SUN avec trois peptides KASH distincts selon un ratio stœchiométrique 3:3. Chaque peptide KASH, s'insère au niveau du KASH-lid d'un domaine SUN et le bout de l'extrémité C-terminale du peptide KASH, s'emboîte avec une complémentarité parfaite dans une poche de liaison (binding pocket) sur le protomère SUN ([Figure 34](#)). La mutation de résidus au niveau de l'extrémité C-terminale d'un peptide KASH ou de résidus constituant le KASH-lid ou la poche de liaison, diminue considérablement l'interaction entre le domaine SUN et le peptide KASH. L'arrangement trimérique de SUN2 par ses régions coiled-coil est également une condition nécessaire à la formation du complexe LINC, des mutations au niveau de ces régions perturbent l'interaction KASH/SUN (Nie et al., 2016; Sosa et al., 2012). Plus récemment, des travaux ont montré que la stabilité de cette interaction, particulièrement lorsqu'elle est soumise à des forces de tension, dépend notamment de l'existence d'un pont disulfure entre une cystéine du domaine SUN de SUN2 et une cystéine du domaine KASH de la nesprine-2 (Jahed et al., 2015).

L'effet des modifications post-traductionnelles de SUN2 sur la formation du complexe LINC n'est encore que peu connu. Il a été montré que le site de glycosylation de SUN2 n'a pas d'effet sur l'interaction SUN/KASH (Sosa et al., 2012; Stewart-Hutchinson et al., 2008). Des sites de phosphorylation de SUN2 sont également référencés sur des bases de données (PhosphoSitePlus® par exemple) mais les kinases impliquées et l'effet de ces phosphorylations sur le complexe LINC restent à déterminer. Il a été montré que SUN1 peut être phosphorylée par la protéine kinase C, ce qui favorise l'export des ARN messagers (ARNm) dans le cytosol (Li et al., 2017). Cependant, la perturbation de l'interaction de SUN1 avec les nesprines n'a pas d'effet sur l'export des ARNm. SUN1 est également phosphorylée en mitose par Plk1 et Cdk1, entraînant la perte de son interaction avec la lamine A/C, l'émerine et les isoformes des nesprines ancrées dans la membrane nucléaire interne. Cette phosphorylation n'a néanmoins pas d'effet sur le complexe LINC qui est maintenu (Patel et al., 2014).

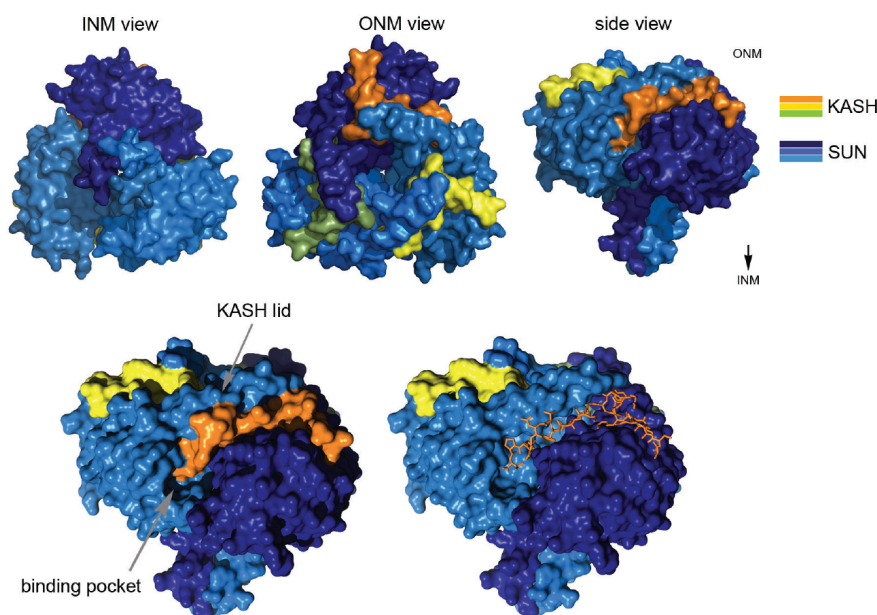


FIGURE 34 : L'INTERACTION SUN/KASH

Représentation de l'interaction KASH/SUN vue depuis la membrane nucléaire interne (INM view), depuis la membrane nucléaire externe (ONM view) et de côté (side view). Trois peptides KASH (jaune, orange, vert) s'insèrent dans les KASH-lid et les poches de liaison de chaque protomère formant le trimère de SUN2 (dégradé de bleus) (d'après Rothballer et al., 2013) (représentation du complexe SUN2/KASH2 humain, PDB ID : 4XDS).

2. Ses rôles

De par sa localisation à l'interface entre le cytosquelette et le noyau, la protéine SUN2 participe à la régulation de processus cellulaires dans plusieurs compartiments. Le complexe LINC contribue ainsi au contrôle de la forme du noyau et de la structure de l'enveloppe nucléaire. Il permet également l'ancrage du noyau lors de la migration et influence l'organisation du cytosquelette. Grâce à son domaine nucléoplasmique, SUN2 interagit aussi avec des protéines régulatrices du génome, notamment au cours de la réponse aux dommages à l'ADN et au cours de la division cellulaire. Des travaux plus récents mettent également en évidence, que le complexe LINC est un acteur important de la mécanotransduction, en transmettant des signaux mécaniques entre le cytosquelette et le noyau. Enfin, il convient de noter que la protéine SUN2 faisant partie des deux seules protéines SUN ubiquitaires avec SUN1, elle possède à la fois des fonctions propres et des fonctions redondantes avec SUN1 (Lei et al., 2009; Zhu et al., 2017).

2.1 La détermination de la structure de l'enveloppe nucléaire

Alors que des interactions entre le cytosquelette et l'enveloppe nucléaire avaient été mises en évidence grâce à la microscopie électronique (Lehto et al., 1978), les travaux fondateurs de Donald Ingber et de son équipe ont montré que la forme de la cellule et du noyau sont dépendants de la tension générée par le cytosquelette d'acto-myosine (Sims et al., 1992). À l'interface avec le cytosquelette, il n'est pas surprenant que le complexe LINC ait été décrit comme un régulateur important de la forme du noyau et de la structure de l'enveloppe. Il a en effet été montré que la déplétion des nesprines, induit des déformations du noyau et une augmentation de sa taille (Lu et al., 2012b; Lüke et al., 2008; Zhang et al., 2007). Des observations par microscopie électronique ont également mis en évidence que la co-déplétion de SUN1 et de SUN2 dans des cellules HeLa induit des dilatations de la membrane nucléaire externe et un écartement anormal de l'espace périnucléaire de plus de 100 nm (Crisp et al., 2006). Le domaine luminal de SUN2 s'étendant sur environ 48 nm, ce qui correspond à la largeur moyenne de l'espace périnucléaire, il a été suggéré que le complexe LINC fonctionnerait donc comme un écarteur pour maintenir une distance de 40 à 50 nm entre les membranes nucléaires interne et externe (Rothballer et al., 2013; Sosa et al., 2012) ([Figure 35](#)). Cependant, Cain *et al.*, montrent que le complexe LINC n'est requis pour maintenir l'espace périnucléaire que dans les cellules soumises à des forces mécaniques importantes (Cain and Starr, 2015; Cain et al., 2014).

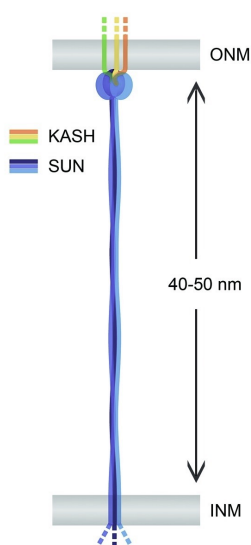


FIGURE 35 : LE COMPLEXE LINC CONTRIBUE AU MAINTIEN DE L'ESPACE PÉRINUCLÉAIRE

(Rothballer et al., 2013)

2.2 La dynamique du cytosquelette

Le complexe LINC est également le déterminant majeur des propriétés physiques et mécaniques des cellules. La perturbation du complexe LINC induit un assouplissement du cytosquelette entraînant une perte de la rigidité cellulaire (Stewart-Hutchinson et al., 2008) ainsi qu'une désorganisation du cytosquelette d'actine et de filaments intermédiaires périnucléaire (Lombardi et al., 2011). L'organisation des microtubules est également dépendante des protéines du complexe LINC. Dans un modèle de kératinocytes issus de souris déficientes pour SUN2, les microtubules ne parviennent pas à se réorganiser sous la forme d'une cage périnucléaire et de lamelles au niveau de la périphérie cellulaire, suite à la formation d'adhérences intercellulaires, comme ils le font dans les cellules contrôles (Stewart et al., 2015).

Alors que des travaux avaient mis en évidence l'implication de SUN1 et SUN2 dans la formation de filaments d'actine au niveau nucléaire (Plessner and Grosse, 2015; Plessner et al., 2015), une publication récente suggère également que les protéines SUN contrôlent la formation du cytosquelette d'actine dans le cytosol. Les auteurs ont montré que les protéines SUN régulent l'activité de la GTPase RhoA de façon antagoniste. SUN2 favorise l'augmentation du pool de RhoA active, alors que SUN1 inhibe l'activité de RhoA. Cela suggère que la formation des fibres de stress dépendante de RhoA pourrait être favorisée par SUN2 et inhibée par SUN1 (Thakar et al., 2017). Cependant, les mécanismes moléculaires de cette régulation ne sont pas élucidés.

2.3 L'ancrage et les mouvements du noyau au cours de la migration

Le complexe LINC joue également un rôle dans l'ancrage et le positionnement du noyau au sein de la cellule *in vitro* et *in vivo* (Alam et al., 2015; Grady et al., 2005; Horn et al., 2013; Lei et al., 2009; Stewart et al., 2015). Cette fonction a pour la première fois été mise en évidence dans des souris transgéniques invalidées pour le gène codant pour la nesprine-1 et dans des souris invalidées pour *SUN1* et *SUN2*. Dans les cellules musculaires squelettiques, la nesprine-1 et les protéines SUN sont

nécessaires à l'agrégation et à l'ancrage des noyaux à la jonction neuromusculaire (Grady et al., 2005; Lei et al., 2009).

Le positionnement du noyau au sein de la cellule est un élément important, notamment lors de la migration où les mouvements du noyau doivent être en coordination avec la dynamique du cytosquelette pour établir la polarisation cellulaire (Friedl et al., 2011). De nombreux travaux ont d'ailleurs montré que la perturbation du complexe LINC induit des défauts de la polarisation et de la migration cellulaires (Chancellor et al., 2010; King et al., 2014; Lombardi et al., 2011; Lovett et al., 2013; Maninová et al., 2013; Wang et al., 2012).

Des structures composées d'actine appelées « transmembrane actin-associated nuclear (TAN) lines » sont impliquées dans le contrôle des mouvements nucléaires au cours de la migration. Les TAN lines sont des assemblages linéaires présents dans les cellules adhérentes (Obino et al., 2016) composés de câbles d'actine dorsaux directement liés à la nesprine-2G et à SUN2 spécifiquement (SUN1 n'est pas impliquée dans le processus), formant des lignes visibles à la surface du noyau. Lors de la migration, les TAN lines permettent l'établissement de la polarisation cellulaire en ramenant le noyau vers l'arrière de la cellule (Chang et al., 2015; Luxton et al., 2010, 2011). L'ancrage des TAN lines au niveau nucléaire est favorisé par l'interaction de SUN2 avec les lamines, une déficience en lamine A/C ou SUN2 induit un glissement des TAN lines sur un noyau qui reste alors immobile (Folker et al., 2011; Versaevel et al., 2014). La protéine Spindle Associated Membrane protein 1 (Samp1) stabilise cet ancrage en interagissant avec SUN2 et la lamine A/C (Borrego-Pinto et al., 2012). La formine, formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1 aussi appelée FHOS) participe à la formation des TAN lines et constitue un lien supplémentaire entre la nesprine-2G et l'actine renforçant leur interaction (Antoku et al., 2015; Kutscheidt et al., 2014) ([Figure 36](#)).

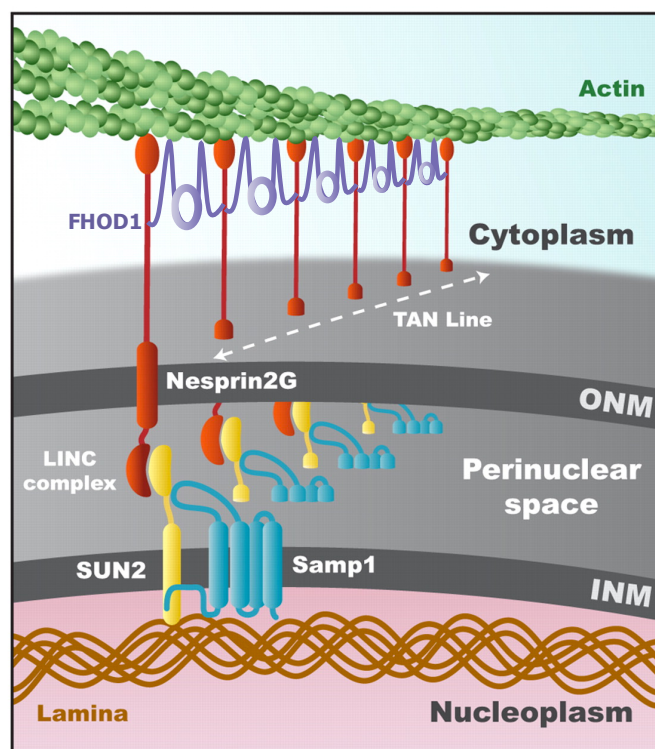


FIGURE 36 : LES TAN LINES

Les TAN lines sont constituées de câbles d'actine (en vert) associés à la nesprine-2G (en rouge) et à SUN2 (en jaune). L'ancrage des TAN lines à l'enveloppe nucléaire est stabilisé par l'interaction de SUN2 avec les lamines (en marron) et Samp1 (en bleu). La formine FHOD1 (en violet) renforce l'interaction de la nesprine-2G avec l'actine (d'après Borrego-Pinto et al., 2012).

Une autre structure de filaments d'actine recouvrant le noyau a également été décrite. Cette structure appelée « actin cap » (Khatau et al., 2009; Maniotis et al., 1997) est, de la même manière que les TAN lines liée au noyau par le complexe LINC. Ces structures sont hautement similaires, cependant l'actin-cap est directement liée à des adhérences focales, ce qui n'a pas été observé pour les TAN lines (Gay et al., 2011; Kim et al., 2012) (Figure 37). Cette association confère à l'actin cap une sensibilité particulière aux forces extérieures, telles que le shear stress ou aux propriétés de rigidité de la MEC qui induisent sa formation (Chambliss et al., 2013). L'actin cap a également un rôle dans l'orientation du noyau au cours de la migration (Kim et al., 2014; Maninová and Vomastek, 2016; Maninova et al., 2017) et permet de réguler la morphologie nucléaire en fonction de la géométrie des adhérences (Khatau et al., 2009).

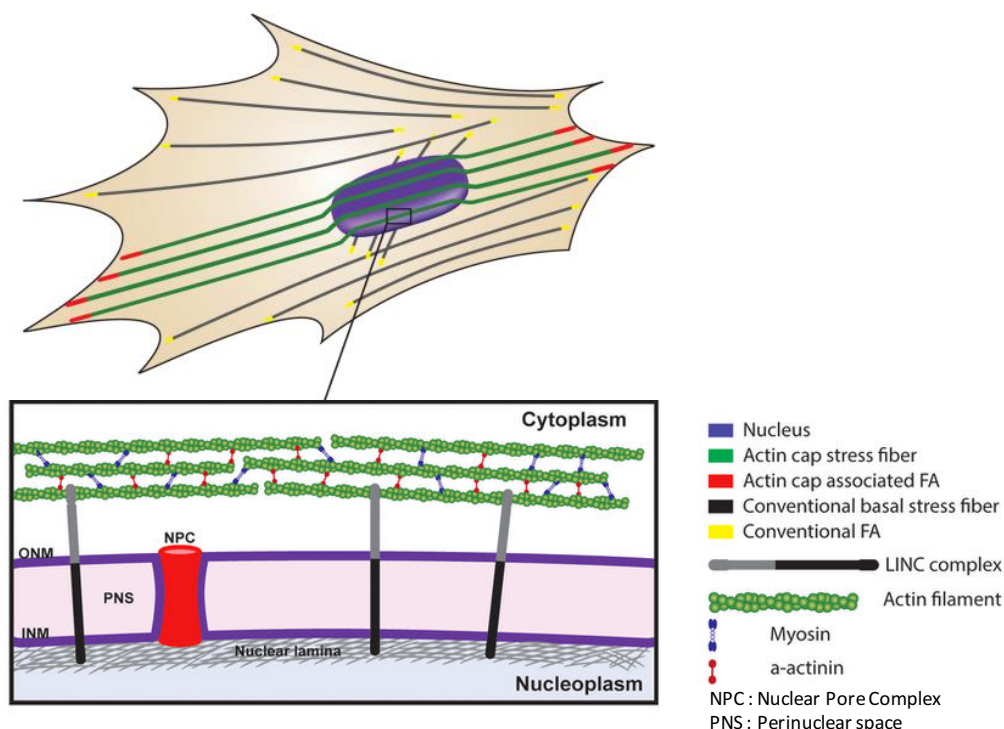


FIGURE 37 : L'ACTIN CAP PÉRINUCLÉAIRE

L'actin cap est composée de filaments d'actine associés à de l' α -actinine et à de la myosine. Elle recouvre le noyau auquel elle est ancrée par le complexe LINC et se termine par des adhérences focales (FA) à la périphérie cellulaire distinctes des adhérences focales conventionnelles. (d'après Kim et al., 2012).

Les protéines du complexe LINC jouent également un rôle dans la régulation des mouvements nucléaires lors de la migration cellulaire en 3D. Le noyau est en effet soumis à des forces de compression et de tension, lorsque les cellules migrent en 3D. Il a été montré que le noyau sépare alors physiquement le cytoplasme en deux compartiments, un compartiment antérieur à la pression élevée et un postérieur derrière le noyau, à la pression faible. La nesprine-3 associée à la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine tire le noyau vers l'avant à la manière d'un piston, pour créer cette pression importante à l'avant de la cellule. Cela suggère que la tension générée par la myosine pourrait être transmise au complexe LINC pour tirer le noyau afin de guider la migration cellulaire (Petrie et al., 2014).

2.4 La transmission des forces

Le complexe LINC permet également la transmission de forces depuis le cytosquelette vers le noyau, qui vont alors modifier le phénotype et les fonctions cellulaires.

La preuve de l'existence de la transmission de forces extérieures jusqu'au noyau, a été mise en évidence plusieurs années avant la découverte du complexe LINC. En tirant sur les intégrines à l'aide de micropipettes ou de microbilles, le cytosquelette se réorganise et le noyau se déforme (Maniotis et al., 1997). Cependant, les mécanismes moléculaires permettant cette transmission de forces au noyau étaient encore mal compris. La mise en évidence du complexe LINC a permis d'établir un lien physique direct entre le cytosquelette et le nucléosquelette, éléments « porteurs » des forces mécaniques au sein de la cellule. Le complexe LINC a donc ainsi été naturellement testé comme acteur potentiel dans la transmission des forces (Figure 38).

Il a été montré que le complexe LINC contrôle les modifications de la morphologie nucléaire induites par des forces de tension extracellulaires. La déplétion du complexe LINC réduit la transmission des forces au sein de la cellule et les défauts nucléaires induits par ces forces (Lombardi et al., 2011; Lovett et al., 2013). La preuve d'une réelle propagation de forces à travers le complexe LINC a pu être mise en évidence par la technique de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Son utilisation dans des fibroblastes, a permis de montrer que la nesprine-2G est directement soumise à des forces mécaniques dépendantes de la contraction du cytosquelette d'acto-myosine et de la morphologie cellulaire (Arsenovic et al., 2016). Cependant, l'absence de calibration dans cette étude, ne permet pas de connaître la quantité de force mise en jeu.

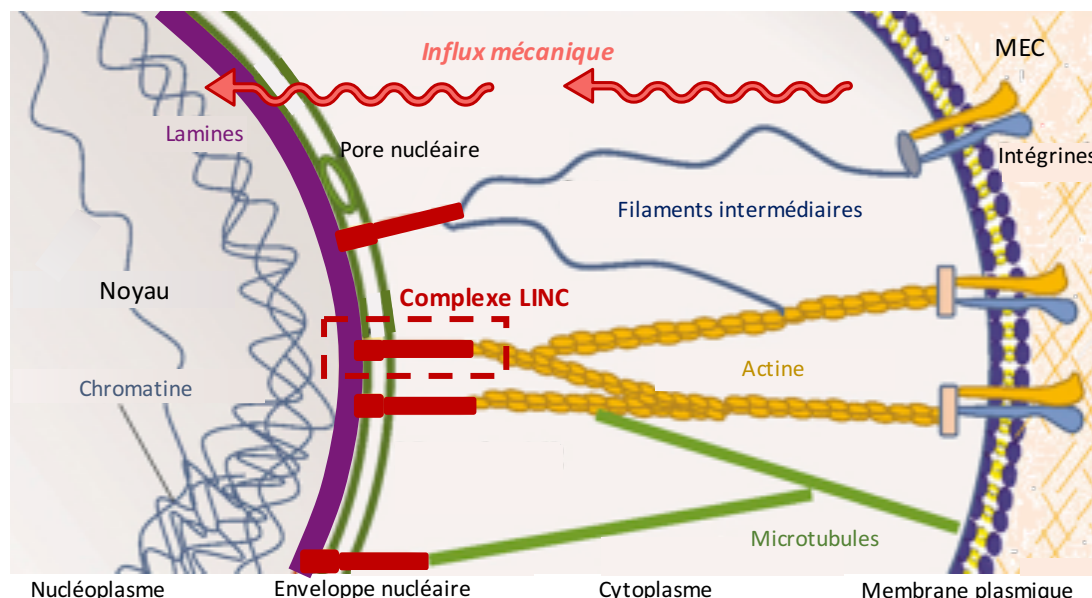


FIGURE 38 : LE PARCOURS D'UN STIMULUS MÉCANIQUE AU SEIN DE LA CELLULE

Les forces perçues par les intégrines au niveau de la MEC sont transmises au cytosquelette puis au noyau *via* le complexe LINC (entouré en pointillés rouges) (Liu et al., 2016).

Le complexe LINC participe également à la réponse aux forces extérieures, comprenant la modification de l'expression de gènes induite par les stimuli mécaniques. Il a été montré que la rigidité de la MEC influence l'expression et stabilité de la lamine-A. L'augmentation de la rigidité réduit sa phosphorylation l'empêchant d'être dégradée. De plus, cette stabilité de la lamine-A induite par la rigidité rétrocontrôle positivement sa transcription (Swift et al., 2013). En accord avec ces travaux, Ihalainen *et al.* ont montré, en utilisant des anticorps reconnaissant sélectivement les épitopes de la lamine A/C au niveau apical de l'enveloppe nucléaire, que la rigidité de la MEC *via* le cytosquelette d'actine, induit un changement de conformation de la lamine A/C au pôle basal du noyau provoquant une polarisation de sa structure (Ihalainen et al., 2015). Ce mécanisme requiert l'intégrité du complexe LINC, suggérant que celui-ci permet de transmettre les forces extérieures induisant la modification de conformation de la lamine A/C.

L'influence directe du complexe LINC sur la modification de l'expression de gènes en réponse aux forces, a été mise en évidence par l'application directe de forces sur des noyaux isolés. L'application de forces de tension sur la nesprine-1 active la

phosphorylation de l'émerine, ce qui affecte notamment la transcription de la vinculine et du serum response factor (Guilluy et al., 2014).

L'effet des forces mécaniques extérieures sur la transcription est un sujet faisant l'objet de recherches actives. S'il est admis que la transcription est un processus sensible à la rigidité de la MEC (Dupont et al., 2011; Swift et al., 2013), peu d'éléments existent à l'heure actuelle quant aux effets des forces sur l'organisation de la chromatine (Athirasala et al., 2017; Miroshnikova et al., 2017). Il a été montré que des forces appliquées au niveau des adhérences peuvent être transmises jusqu'à l'intérieur du nucléoplasme et y modifier des interactions protéiques au sein des corps de Cajal (Poh et al., 2012).

Tajik *et al.*, ont récemment montré que l'application d'un shear stress à l'aide de billes magnétiques à la surface des cellules Chinese Hamster Ovary, provoque un étirement de la chromatine entraînant la transcription d'un transgène intégré. L'étirement de la chromatine induit par le stress est réduit en l'absence de SUN1 et SUN2 ou de protéines liant la chromatine ou des lamines et également si la contraction du cytosquelette d'acto-myosine est altérée. Ces résultats suggèrent que le stress appliqué au niveau des intégrines se propage du cytosquelette d'actine au complexe LINC, puis aux lamines et aux protéines liant la chromatine pour induire l'étirement de la chromatine et favoriser ainsi la transcription (Tajik et al., 2016).

Le complexe LINC participe donc à la modification de l'expression de gènes en réponse aux forces. Ces modifications de l'expression de gènes peuvent induire des altérations du phénotype et des fonctions cellulaires. Par exemple, l'augmentation de l'expression de la lamine-A avec la rigidité de la MEC stimule la différenciation ostéogénique *via* la voie du récepteur à l'acide rétinoïque (Swift et al., 2013). Il a également été montré que le complexe LINC participe à la régulation de la différenciation myogénique en réponse au stretch (Brosig et al., 2010).

Le complexe LINC participe donc à la réponse cellulaire aux forces mécaniques extérieures en transmettant ces forces au sein de la cellule, contribuant ainsi au processus de mécanotransduction. Cependant, ce processus n'est pas unidirectionnel, puisque des travaux récents montrent que les propriétés mécaniques

du noyau peuvent également modifier l'organisation du cytosquelette *via* le complexe LINC (Guilluy et al., 2014; Schwartz et al., 2017). Ainsi, des altérations de la lamina ou du complexe LINC peuvent, en modifiant l'organisation du cytosquelette d'actine, affecter la réponse de la cellule à son environnement mécanique (Chambliss et al., 2013; Guilluy et al., 2014; Schwartz et al., 2017; Swift et al., 2013).

2.5 La régulation des dommages à l'ADN

Le domaine nucléoplasmique des protéines SUN se trouvant dans le noyau, il est naturel de penser que ces protéines peuvent jouer un rôle au niveau génomique ; SUN1 et SUN2 sont effectivement impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans la transcription de gènes induite par des forces.

Une première étude a montré que la co-déplétion de SUN1 et SUN2 entraîne un arrêt des cellules en phase S du cycle cellulaire, une augmentation de l'apoptose cellulaire et des dommages à l'ADN prononcés (Lei et al., 2012). Les auteurs ont mis en évidence que SUN1 et SUN2 interagissent avec la DNA-dependent protein kinase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN par jonction des extrémités non-homologues (Ciccio and Elledge, 2010; Smith and Jackson, 1999; Weterings and Chen, 2007). Deux autres publications se sont intéressées plus particulièrement aux cassures d'ADN double-brin, dommages à l'ADN pouvant être très délétères pour la cellule s'ils ne sont pas ou mal réparés. Ces cassures peuvent entraîner la perte d'un fragment chromosomique ou des translocations, réarrangements du génome impliqués dans le développement du cancer. Dans des cellules ayant de nombreux dommages à l'ADN, les protéines SUN1 et SUN2 en coopération avec les microtubules et la protéine 53-Binding Protein 1, favorisent la mobilité des cassures d'ADN double-brin induisant une réparation défectueuse par jonction des extrémités non-homologues (Lottersberger et al., 2015). Il a également été montré que SUN2 favorise le regroupement des cassures d'ADN double-brin, processus encore mal connu et potentiellement délétère car il favoriserait la juxtaposition de ces cassures induisant des translocations (Aymard et al., 2017).

2.6 La division cellulaire

Historiquement, le domaine SUN fut identifié au niveau de la protéine Sad1 chez levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* (Malone et al., 1999) ; mais avant même la caractérisation du domaine SUN, Sad1 est décrite comme une protéine associée au « spindle pole body », l'équivalent du centre organisateur des microtubules chez la levure. Ces premiers travaux montrent que *via* cette association, Sad1 joue un rôle primordial dans la formation du fuseau mitotique et un rôle potentiel dans l'assemblage du fuseau méiotique. Ils suggèrent également un rôle structural de la protéine qui ne semble alors pas avoir d'effet sur la nucléation des microtubules (Hagan and Yanagida, 1995). Récemment, il a été confirmé que la présence de Sad1 au niveau de l'enveloppe nucléaire, à l'interface entre le spindle pole body et les chromosomes en interphase, est indispensable à la formation des fuseaux mitotique et méiotique chez la levure à fission (Fernández-Álvarez et al., 2016). Sad1 est également impliquée dans la formation du « bouquet » de télomères lors de la méiose, division sexuée des eucaryotes, ayant pour but la production des gamètes (Chikashige et al., 2006; Tomita and Cooper, 2006). Lors de la prophase méiotique, dans la plupart des organismes eucaryotes, les chromosomes s'attachent et se regroupent à l'enveloppe nucléaire *via* leurs télomères, formant une configuration appelée « bouquet », particulièrement importante pour l'appariement et la recombinaison des chromosomes homologues. L'implication des protéines à domaine SUN dans la formation du « bouquet » est notamment retrouvée chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* (Conrad et al., 2007), chez la plante *Zea mays* (Murphy et al., 2014), mais également chez les vertébrés.

Lors de la prophase I SUN2 s'associe aux télomères à la surface interne de l'enveloppe nucléaire, suggérant son implication dans la formation du « bouquet » (Harper et al., 2004; Schmitt et al., 2007). Une étude plus récente a montré que l'attachement des télomères est défectueux dans des souris déficientes pour SUN1, indiquant un rôle partiellement redondant des deux protéines lors de la méiose (Link et al., 2014, 2015).

Lors de la mitose les protéines SUN sont particulièrement impliquées dans l'initiation de la rupture de l'enveloppe nucléaire qui se produit dès la prophase chez les eucaryotes réalisant une mitose dite « ouverte » et qui permet ainsi aux microtubules d'entrer en contact avec les kinétochores pour former le fuseau mitotique. Cette rupture comprend plusieurs étapes dont le désassemblage des pores nucléaires et de la lamina nucléaire ainsi que le retrait de la chromatine de l'enveloppe nucléaire (Güttinger et al., 2009). Les microtubules attachés à la surface externe du noyau *via* la dynéine, exercent également des forces de traction favorisant l'invagination et la déchirure de l'enveloppe (Beaudouin et al., 2002; Salina et al., 2002).

La co-déplétion de SUN1 et SUN2 entraîne un retard de la rétraction des membranes de la chromatine lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire et altère la formation des invaginations de l'enveloppe nucléaire permettant normalement la fenestration de l'enveloppe et sa déchirure. Ce même phénotype est observé lorsque la polymérisation des microtubules est inhibée et lorsque le cofacteur de la dynéine Nuclear distribution protein NudE homologue 1/nuclear distribution protein NudE-like 1 (NudE/EL) est déplété. De plus, la co-déplétion des protéines SUN altère le recrutement de la dynéine à l'enveloppe nucléaire lors de la prophase. Le remodelage de l'enveloppe nucléaire lors de l'initiation de la mitose pourrait donc être piloté par un mécanisme impliquant une coopération entre les protéines SUN, NudE/EL, la dynéine et les microtubules. Les auteurs ont également montré que l'interaction SUN-KASH est nécessaire dans la réalisation de ce processus (Turgay et al., 2014).

Le désassemblage des pores nucléaires, la dépolymérisation de la lamina ainsi que la dissociation des protéines de l'enveloppe de leurs partenaires nucléaires sont pilotés par l'activation de plusieurs kinases dont Cdk1 (Foisner and Gerace, 1993; Heald and McKeon, 1990; Laurell et al., 2011; Molitor and Traktman, 2014; Peter et al., 1990; Thompson and Fields, 1996; Tseng and Chen, 2011). La phosphorylation de la lamina par Cdk1 provoque la solubilisation des lamines de type A et leur dispersion dans le cytosol tandis que les lamines de type B restent attachées à des fragments de membrane nucléaire interne et se dispersent dans le réticulum endoplasmique (Georgatos et al., 1997; Gerace and Blobel, 1980; Gerace et al., 1978; Heald and McKeon, 1990; Peter et al., 1990; Stick et al., 1988). À la suite de leur phosphorylation, les protéines ancrées dans la membrane nucléaire interne comme les protéines

Lamina-associated polypeptide (LAP) 1 et 2 (Yang et al., 1997) ou le récepteur à la lamine-B (Ellenberg et al., 1997) se redistribuent également au sein du réticulum endoplasmique qui se réorganise sous forme d'un réseau tubulaire en périphérie du fuseau mitotique après la rupture de l'enveloppe (Güttinger et al., 2009; Puhka et al., 2007).

En effet, en interphase, l'ancrage et la rétention des protéines à la membrane nucléaire interne fonctionnent selon un modèle de diffusion/rétention. Les protéines diffusent librement et rapidement au niveau des membranes composant le réticulum endoplasmique, puis elles s'immobilisent une fois localisées à la membrane nucléaire interne. Cette immobilisation est médiée par leur interaction avec la lamina nucléaire, la chromatine et d'autres protéines de l'enveloppe (Ellenberg et al., 1997; Ungricht et al., 2015; Vaughan et al., 2001). Lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire en mitose, la phosphorylation des protéines de la membrane nucléaire interne entraîne une perte de leur interaction avec leurs partenaires ce qui leur permet de se disperser dans le réticulum endoplasmique (Champion et al., 2017) ([Figure 39](#)).

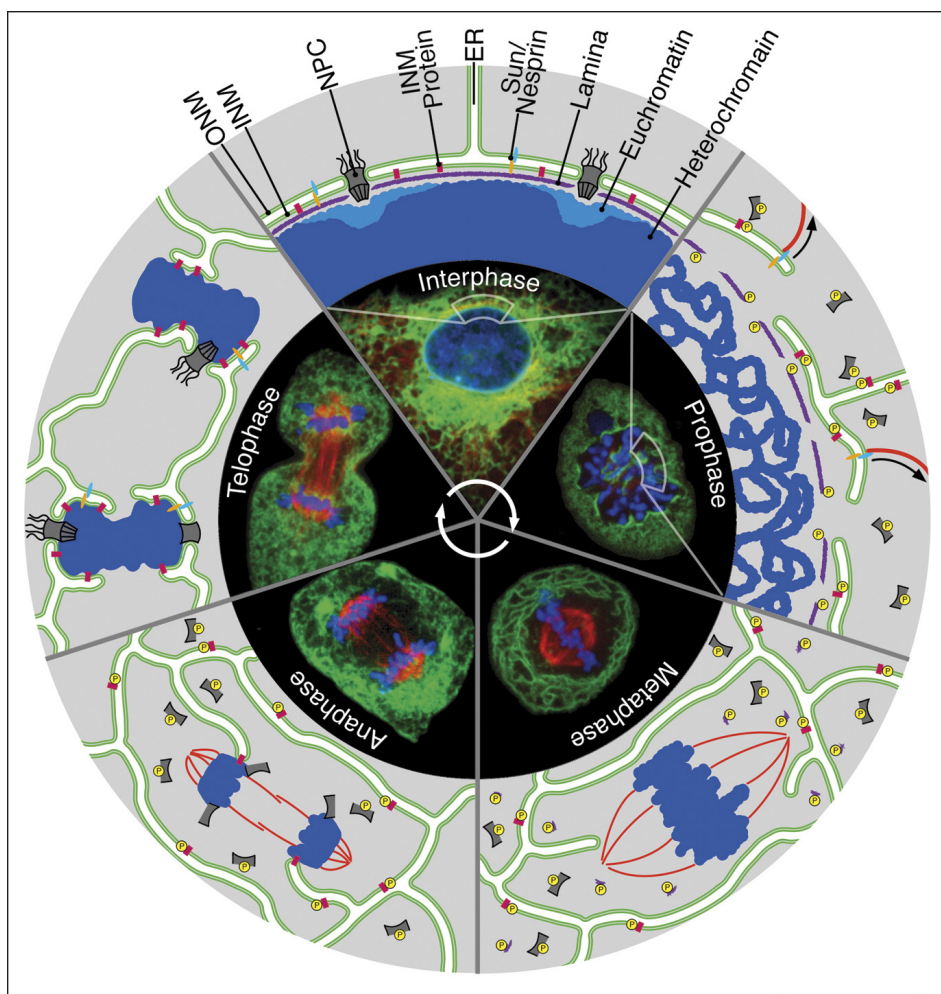


FIGURE 39 : LA DYNAMIQUE DE L'ENVELOPPE NUCLÉAIRE AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE

Le remodelage de l'enveloppe est présenté de façon schématique et parallèlement par des images de marquages immunofluorescents. Le reticulum endoplasmique (ER), la membrane nucléaire interne (INM) et la membrane nucléaire externe (ONM) composant l'enveloppe nucléaire sont marqués en vert par Sec61 β (aa1-65)GFP, les microtubules par l' α -tubuline-mcherry en rouge et la chromatine est marquée avec du Hoechst 33342 en bleu. En interphase, de nombreuses protéines sont présentes au sein de l'enveloppe nucléaire. Les pores nucléaires (NPC), larges complexes qui traversent l'enveloppe permettant les échanges entre le noyau et le cytoplasme ; les protéines du complexe LINC, SUN et nesprines ; ainsi que des protéines ancrées dans la membrane nucléaire interne (INM protein) qui lient la lamina nucléaire comme les LAP ou le récepteur à la lamine-B. Lors de la prophase, la rupture de l'enveloppe est initiée par la phosphorylation des protéines des pores nucléaires, des lamines et des protéines de la membrane nucléaire interne ce qui permet leur désassemblage et la rupture de leurs interactions. Parallèlement, les microtubules *via* la dynéine et potentiellement les protéines SUN, exercent des forces de traction (flèches) participant à la déchirure de l'enveloppe. En métaphase, l'enveloppe nucléaire est totalement redistribuée au sein du réticulum. En anaphase les extrémités des tubules du réticulum se lient à la chromatine initiant la reformation de l'enveloppe, qui nécessite également la déphosphorylation des protéines la constituant. En télophase, les membranes s'étendent autour des chromosomes pour compléter la reformation totale de l'enveloppe (Anderson and Hetzer, 2008).

Il a été montré que SUN1 est phosphorylée au niveau de son extrémité N-terminale par Plk1 et Cdk1 entraînant la perte de son interaction avec la lamine A/C, l'émerine et les isoformes des nesprines ancrées dans la membrane nucléaire interne. De plus la phosphorylation de SUN1 réduit son ancrage à l'enveloppe nucléaire, suggérant que la perte d'interaction avec ses partenaires pourrait favoriser sa diffusion et sa redistribution dans le réticulum endoplasmique (Patel et al., 2014). Ces travaux montrent également que l'interaction de SUN1 avec la nesprine-2, constituant le complexe LINC, est maintenue lors de la mitose.

Cependant la localisation des protéines SUN n'est pas encore bien définie au cours de la mitose. SUN1 est dispersée dans le cytosol en périphérie du fuseau mitotique en métaphase et s'accumule à la bordure externe des chromosomes à l'entrée en anaphase, participant à la reformation de l'enveloppe nucléaire. Lors de la reformation de l'enveloppe, SUN1 est également impliquée dans la décondensation de l'ADN (Chi et al., 2007).

Il a également été montré que SUN1 interagit avec Samp1 lors de la mitose (Patel et al., 2014). Samp1, ancrée dans la membrane nucléaire interne en interphase est localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique en métaphase et a été décrite comme un composant potentiel de la matrice du fuseau mitotique (Buch et al., 2009; Figueroa et al., 2010). Cette matrice, dont l'existence est encore contestée, serait une structure membranaire et protéique dépourvue de microtubules, entourant le fuseau mitotique et ayant un rôle dans son assemblage. Elle constituerait également un support pour les protéines motrices des microtubules générant des forces au sein du fuseau (Johansen and Johansen, 2007; Scholey et al., 2001; Schweizer et al., 2014; Wells, 2001; Zheng, 2010). Chez les vertébrés, elle serait notamment composée de la lamine-B dont l'assemblage sous forme d'un réseau membranaire autour du fuseau mitotique est stimulé par la GTPase Ran, la dynéine et NudEL (Ma et al., 2009; Tsai et al., 2006). Les protéines SUN pourraient également faire partie de cette structure. D'autres investigations sont cependant nécessaires afin d'éclaircir le rôle des protéines SUN au cours de la mitose et plus particulièrement de la métaphase.

2.7 Implication dans les maladies

In vivo, les protéines SUN sont indispensables au développement, la délétion de *SUN1* et *SUN2* chez la souris induisant une incapacité des animaux à respirer et une létalité néonatale. Ces anomalies sont en partie dues à un défaut de développement du système nerveux central car les protéines SUN, en association avec les nesprines, contrôlent les mouvements nucléaires lors de la migration neuronale ou nucléokinèse (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2009). Les protéines SUN jouent également un rôle dans l'ancrage des noyaux dans les cellules musculaires squelettiques à la jonction neuromusculaire (Grady et al., 2005; Lei et al., 2009).

Ces défauts au niveau musculaire sont retrouvés dans des modèles de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, maladie causée par des mutations sur le gène *LMNA* codant pour les lamines de type A et le gène *EMD* codant pour l'émerine (Méjat et al., 2009). Dans des patients présentant un phénotype cellulaire semblable à celui observé dans cette pathologie, des mutations sur les gènes codant pour la nesprine-1 et la nesprine-2 ont également été identifiées (Méjat and Misteli, 2010; Zhang et al., 2007). Jusqu'ici, aucune mutation sur les gènes codant pour les protéines SUN n'a été identifiée comme la cause primaire d'une pathologie, mais des variants rares de *SUN1* et *SUN2* ont été trouvés dans des patients atteints de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. La présence de ces variants augmente la sévérité de la pathologie suggérant un rôle important des protéines SUN dans la pathogenèse de cette dystrophie musculaire (Li et al., 2014; Meinke et al., 2014; Taranum et al., 2012b).

La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss fait partie d'un groupe de pathologies appelées laminopathies, car elles sont causées par des mutations sur le gène *LMNA* codant pour les lamines de type A. Les cellules des patients atteints de ces pathologies présentent de nombreux défauts nucléaires, morphologiques (Goldman et al., 2004; Raharjo et al., 2001) et mécaniques (Broers et al., 2004; Dahl et al., 2006; Lammerding et al., 2004). Il a été montré que les protéines SUN sont impliquées dans la pathogénèse du syndrome de Hutchinson-Gilford ou progeria, une autre laminopathie caractérisée par un vieillissement prématuré (Eriksson et al., 2003; Hale et al., 2008; Starr, 2012). Une accumulation anormale de *SUN1* au niveau de

l'enveloppe nucléaire et de l'appareil de Golgi a été observée dans des cellules de patients atteints de progeria ainsi que dans un modèle murin de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. Cette accumulation de SUN1 est due à une réduction du renouvellement de la protéine et contribue au développement des défauts nucléaires et cellulaires caractéristiques de ces pathologies. De plus, la déplétion de SUN1 corrige les défauts de la fonction cardiaque et du squelette observés dans le modèle murin (Chen et al., 2012).

Dans d'autres pathologies comme le cancer, SUN2 a été décrit comme un suppresseur de tumeurs, la réduction de son expression a été retrouvée dans des tumeurs pulmonaires (Lv et al., 2015), du système nerveux central (Hsieh et al., 2014) et mammaires (Matsumoto et al., 2015).

Plus récemment, un rôle de SUN2 a été mis en évidence dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. La déplétion de SUN2 dans les lymphocytes T CD4⁺, cellules principalement utilisées par le virus pour se répliquer, altère l'activation et la prolifération des cellules, conduisant à une réduction du taux d'infection par le virus (Donahue et al., 2016, 2017; Schaller et al., 2017).

La protéine SUN2

En résumé

- La protéine SUN2 fait partie de la famille des **protéines à domaine SUN** très **conservée au cours de l'évolution**. Au nombre de cinq chez les mammifères, les protéines SUN sont des **protéines transmembranaires** ancrées dans la membrane interne de **l'enveloppe nucléaire**. Seules les isoformes **SUN1 et SUN2 sont ubiquitaires**.
- L'extrémité N-terminale de SUN2 lie les **lamines** dans le nucléoplasme. Le **domaine SUN** de SUN2 porté par son extrémité C-terminale, lui permet de lier des protéines à **domaine KASH** telles que les **nesprines**, dans l'espace périnucléaire. La **trimérisation** de SUN2 favorise cette interaction.
- L'interaction SUN/KASH forme un **pont entre le cytosquelette et le nucléosquelette** appelé **le complexe LINC**.
- Le complexe LINC structure l'enveloppe nucléaire, est impliqué dans l'ancrage du noyau lors de la migration cellulaire, mais permet également la **transmission de forces** depuis les éléments du cytosquelette, vers le noyau. Il participe donc au processus de **mécanotransduction**.
- SUN2 est impliquée dans la régulation des **dommages à l'ADN** ainsi que dans les phases d'initiation de la **méiose** et de la **mitose**, principalement la **rupture de l'enveloppe nucléaire**.

OBJECTIFS DE THÈSE

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux travaux de la littérature soulignent l'importance de la régulation des fonctions cellulaires par l'environnement mécanique. Que ce soit *in vivo* ou dans des modèles expérimentaux de cultures cellulaires, la rigidification de la MEC provoque une augmentation de la prolifération qui peut compromettre l'homéostasie tissulaire. Néanmoins, les mécanismes moléculaires sous-jacents contrôlant ce processus sont encore peu connus. Pour mieux comprendre, nous nous sommes intéressés à la division cellulaire proprement dite, la mitose.

Notre objectif premier a été de mettre en évidence l'impact de la rigidité de la MEC sur la progression mitotique. Ayant montré que la durée de la mitose est bien sensible à la rigidité, nous avons voulu ensuite découvrir les mécanismes moléculaires régulant ce processus. Une analyse protéomique nous a permis d'identifier la protéine SUN2 comme un potentiel régulateur de ce mécanisme. SUN2 appartient au complexe LINC, particulièrement impliqué dans la transmission de stimuli mécaniques depuis le cytosquelette vers le noyau et constitue donc une bonne candidate.

Sur ces bases nous avons émis l'hypothèse que la protéine SUN2 était impliquée dans la régulation de la mitose en réponse à la rigidité de la MEC. Ainsi, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Déterminer l'effet de la rigidité de la MEC sur la protéine SUN2, son expression, sa transcription et comprendre comment la rigidité régule ces mécanismes.
- Explorer le rôle de SUN2 sur la progression mitotique en inhibant son expression dans des cellules en culture à l'aide d'un small interfering RNA (siRNA) et analyser son impact sur les différentes phases de la mitose.

Afin de répondre à nos objectifs nous avons utilisé des techniques de biochimie, de biologie moléculaire et d'imagerie sur différents types de cellules adhérentes en culture. Ces méthodes sont décrites dans le chapitre ci-après.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Outils cellulaires

1. Cultures cellulaires

1.1 Cellules HeLa

Les cellules HeLa sont une lignée de cellules cancéreuses établie à partir de cellules prélevées en 1951 chez Henrietta Lacks, une jeune femme atteinte d'un cancer du col de l'utérus. Elles ont été obtenues auprès du fournisseur ATCC[®] sous la référence suivante : HeLa (ATCC[®]CCL-2[™]).

Une autre lignée de cellules HeLa a été utilisée : les HeLa Kyoto EGFP- α -tubulin/H2B-mCherry (référence 330670 chez Cell Lines Service). Ces cellules expriment constitutivement la tubuline couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP) et l'histone H2B couplée à la mCherry, une protéine fluorescente rouge ; ce qui est particulièrement intéressant pour visualiser les phases de la mitose en microscopie, sans effectuer de marquage préalable.

Les cellules sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco[®]) à 4,5 g/L de glucose supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) 10% et antibiotiques, pénicilline/streptomycine 1% dans une atmosphère à 37°C, 5% de CO₂. Le milieu est changé 3 fois par semaine. À 80% de confluence, les cellules sont dissociées dans la trypsine - acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 0,05% (Gibco[®]) et centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes dans du milieu à 10% de sérum. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture puisensemencé dans de nouvelles boîtes de culture ou sur les supports spécifiques utilisés pour chaque expérience.

1.2 Cellules A7r5

Les cellules A7r5 sont une lignée de cellules musculaires lisses d'aorte thoracique de rat (*Rattus norvegicus*). Elles ont été obtenues auprès du fournisseur ATCC® sous la référence suivante : A7r5 (ATCC®CRL-1444™).

Les cellules sont cultivées dans du DMEM (Gibco®) à 1 g/L de glucose supplémenté en SVF 10% et antibiotiques, pénicilline/streptomycine 1% dans une atmosphère à 37°C, 5% de CO₂. Le milieu est changé toutes les 2 jours. À 80% de confluence, les cellules sont dissociées dans la trypsine - EDTA 0,05% (Gibco®) et centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes dans du milieu à 10% de sérum. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture puisensemencé dans de nouvelles boîtes de culture ou sur les supports spécifiques utilisés pour chaque expérience.

1.3 Mouse Embryonic Fibroblasts

Les fibroblastes embryonnaires de souris (*Mus musculus*) (MEF) utilisés sont le généreux don du Dr Daniel Bouvard (Institute for Advanced Biosciences, Centre de Recherche UGA/Inserm U 1209/CNRS UMR 5309, Grenoble).

Les cellules sont cultivées dans du DMEM (Gibco®) à 1 g/L de glucose supplémenté en SVF 10% et antibiotiques, pénicilline/streptomycine 1% dans une atmosphère à 37°C, 5% de CO₂. Le milieu est changé toutes les 2 jours. À 80% de confluence, les cellules sont dissociées dans la trypsine - EDTA 0,05% (Gibco®) et centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes dans du milieu à 10% de sérum. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de culture puisensemencé dans de nouvelles boîtes de culture ou sur les supports spécifiques utilisés pour chaque expérience.

2. Matrices de différentes rigidités

Afin d'observer l'effet de la rigidité sur le phénotype cellulaire, les cellules ont été cultivées sur des boîtes de Pétri (Petrisoft 35™ Matrigen) contenant des gels de polyacrylamide de différentes rigidités (0,2-1-8-12 et 50 kPa) recouvertes de collagène de type I.

L'utilisation de gels de polyacrylamide biocompatibles permet de faire varier la rigidité sans faire varier la concentration de ligand (collagène, fibronectine) qui reste toujours constante entre les différentes conditions.

Pour l'immunofluorescence, des plaques 12 puits contenant des lamelles (Softslip 12™ Matrigen) recouvertes de gels de polyacrylamide de 1 et 50 kPa recouvertes de collagène I ont été utilisées.

3. Synchronisation des cellules en mitose

Pour la synchronisation en mitose, les cellules ont été traitées avec 5 µM de S-trityl-L-cysteine (STC) (référence 164739 chez Sigma-Aldrich®) pendant 16 heures. Le STC est un inhibiteur de la kinésine Eg5 bloquant spécifiquement la progression mitotique en retardant la formation du fuseau (Skoufias et al., 2006).

Afin de ne récupérer que les cellules en mitose, la technique de mitotic-shake-off a été utilisée à l'issue du traitement par le STC. Les cellules sont d'abord rincées au PBS de façon très douce, le but étant d'enlever les débris et les cellules mortes sans décoller les cellules en mitose. La flasque de culture est ensuite tapée contre la paillasse (shake-off). Les cellules en mitose étant arrondies et ne possédant que peu d'adhérences, elles se décollent alors de la flasque. Une vérification du bon décollement des cellules est effectuée par observation au microscope. Les cellules en mitose qui flottent désormais dans le milieu de culture sont collectées et concentrées par centrifugation 3 minutes à 1000 g, puis utilisées pour analyser l'expression protéique par western blot.

4. Extinction de l'expression protéique

4.1 siRNAs

- Séquence du siRNA SUN2 rat (Unc84bRSS342353(3_RNAI), Invitrogen™) :

sens : 5' GAC UCG GAA GAC CUA UUC AAG AAG A 3'

antisens : 5' U CUU CUU GAA UAG GUC UUC CGA GUC 3'

- siRNA SUN2 humain : SASI_Hs01_00176980 (Sigma-Aldrich®)

- siRNA SUN1 humain : SASI_Hs01_00032809 (Sigma-Aldrich®)
- Séquence du siRNA FHOD1 humain (Eurogentec) :
sens : 5' AGA CCA GGA CAU GCU GAA 3'
antisens : 5' UUC AGC ATG TCC TGG TCT 3'
- siRNA contrôle : *Silencer*TM Negative Control No. 1 siRNA (AmbionTM AM4611)

4.2 Transfection des siRNAs

Les cellules en culture, HeLa et A7r5 sont utilisées à 70% de confluence pour la transfection. Elles sont transfectées avec un siRNA par lipofection avec la Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fournisseur (*Protocol Pub. No. MAN0007825 Rev.1.0*).

La Lipofectamine[®] RNAiMAX est diluée dans le milieu de culture correspondant à chaque type cellulaire à 0% SVF. Les siRNAs (concentration finale = 10 µM) sont dilués dans le milieu de culture 0% SVF correspondant à chaque type cellulaire. La Lipofectamine[®] RNAiMAX diluée est ajoutée au siRNA dilué (ratio 1:1). Le tout est incubé 5 minutes à température ambiante. Les complexes Lipofectamine[®] RNAiMAX/siRNA sont ajoutés aux cellules, incubées 48 heures dans une atmosphère à 37°C, 5% de CO₂.

La déplétion des protéines est ensuite validée par western blot.

5. Évaluation de la stabilité de SUN2

Afin d'évaluer la stabilité de SUN2, les cellules ont été traitées avec un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide (référence C7698 chez Sigma-Aldrich[®]).

Les A7r5 sont mises en culture 12 heures dans des plaques 12 puits contenant des lamelles (Softslip 12TM Matrigen) recouvertes de gels de polyacrylamide de 1 et 50 kPa recouvertes de collagène I. Puis 50 µg/mL de cycloheximide sont ajoutés au milieu de culture pendant 12 heures. À la suite de cette incubation les cellules sont

rincées au phosphate-buffered saline (PBS) 1X pH 7,4 à 37°C puis fixées au paraformaldéhyde 4% 15 minutes à température ambiante pour analyser l'expression de SUN2 par immunofluorescence.

II. Analyse de l'expression protéique par western blot

1. Préparation des échantillons protéiques

Les cellules préalablement cultivées sur des substrats de différentes rigidités ou synchronisées en mitose sont lysées de la façon suivante pour en extraire les protéines. Les cellules sont rincées au PBS 1X pH 7,4 à 37°C puis sont lysées sur glace, avec le tampon suivant dilué au 1/2 dans de l'eau ultra pure : Tris-HCl pH 6,8 0,25 M, Glycérol 20%, dodécylsulfate de sodium (SDS) 10%, β -mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,01%. Les échantillons cellulaires sont ensuite passés 10 secondes au sonicateur pour rompre les membranes cellulaires et fragmenter l'ADN, puis centrifugés 5 minutes à 1000 g à 4°C. Les échantillons sont ensuite dénaturés 6 minutes au bain marie à 95°C.

2. Migration et transfert

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les échantillons protéiques sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose (Trans-Blot[®] Turbo[™] Bio Rad). La qualité du transfert est vérifiée au rouge Ponceau (1 g de rouge Ponceau de chez Sigma-Aldrich[®] dilué dans une solution d'acide acétique 5% dilué dans 1L d'eau), qui colore toutes les protéines de façon non spécifique.

3. Immunomarquage et détection

La membrane est saturée dans 5% de bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich[®]) diluée dans du tris-buffered saline (TBS)/Tween (TBS : Tris 50 mM à pH 7,5, NaCl 150 mM ; Tween20 à 0,1%) pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation puis incubée avec l'anticorps primaire ([Tableau III](#)) toute la nuit à 4°C sous agitation, dilué dans la solution de saturation. Après trois lavages de 5 minutes au

TBS/Tween, la membrane est incubée pendant 45 minutes sous agitation à température ambiante dans l'anticorps secondaire ([Tableau III](#)) couplé à la peroxydase, dilué dans du TBS/Tween. La membrane est ensuite lavée dans du TBS/Tween, du TBS et de l'eau ultra-pure (lavages de 5 minutes à chaque fois).

La détection est réalisée par chimiluminescence (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de chez Thermo Scientific). La révélation des bandes obtenues est réalisée avec un imageur, la caméra Chemidoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) et le logiciel Image Lab™ (Bio-Rad) ou par autoradiographie sur film. La normalisation est faite grâce au gène exprimé de façon constitutive, codant pour la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés ci-dessous :

TABLEAU III : Anticorps utilisés pour l'analyse de l'expression protéique par western blot

Anticorps	Dilution	Référence	Fournisseur
Anti-Unc84B/SUN2	1/1000	06-1038	Millipore™
Anti-FHOD1	1/500	sc-365437	Santa Cruz Biotechnology®
Anti-FHOD1 (Thr-1141), phospho-specific	1/500	FP3481	ECM Biosciences
Anti-Ect2	1/500	sc-1005	Santa Cruz Biotechnology®
Anti-GAPDH	1/5000	sc-166574	Santa Cruz Biotechnology®
Anti-β-actine	1/10 000	A5316	Sigma-Aldrich®
Anti-α-tubuline	1/5000	T9026	Sigma-Aldrich®
Anti-mouse IgG-HRP	1/5000	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology®
Anti-rabbit IgG-HRP	1/5000	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology®

III. Analyse de l'expression de l'ARN messager de SUN2

1. Extraction de l'ARN

L'expression de l'ARNm de SUN2 a été évaluée par PCR quantitative (qPCR) en temps réel à partir d'ARN extraits de cellules A7r5 cultivées 24 heures sur des matrices de 1 kPa et 50 kPa (500 000 cellules/10 cm²).

L'extraction de l'ARN a été réalisée suivant le protocole du TRIzol[®] Reagent (MAN0001271 Ambion[™], Thermo Fisher Scientific) reposant sur la méthode d'extraction au phénol-chloroforme.

Le milieu de culture cellulaire est aspiré et les cellules sont directement lysées avec du TRIzol[®] Reagent (1 mL pour 500 000 cellules). Après homogénéisation, les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 5 minutes pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. 0,2 mL de chloroforme sont ajoutés pour 1 mL de TRIzol[®] Reagent et les tubes sont agités vigoureusement pour bien homogénéiser le tout, puis incubés 3 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C, ce qui permet la séparation du mélange en une phase inférieure organique phénol-chloroforme contenant des protéines dénaturées, une interphase contenant de l'ADN et une phase supérieure aqueuse contenant l'ARN. La phase aqueuse est transférée dans de nouveaux tubes et le protocole RNAqueous[®]-Micro Kit (AM1931 Ambion[™], Thermo Fisher Scientific) est ensuite utilisé pour isoler les ARN. Une fois isolés, les ARN sont enfin dosés à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume Nanodrop[®].

2. Transcription inverse

Pour la transcription inverse, 1 µg d'ARN est utilisé. L'ARN est préalablement dilué dans de l'eau sans ribonucléase (RNAse) et dénaturé pendant 5 minutes à 70°C pour faciliter l'accessibilité des amorces, puis il est immédiatement refroidi 2 minutes sur glace.

Un mix de transcription est constitué parallèlement. Il contient des amorces ou Oligo(dT), des dNTP (mélange des 4 désoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP servant à l'élongation des brins d'ADN néosynthétisés), un inhibiteur des RNases, l'enzyme Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (référence 28025013, Thermo Fisher Scientific) catalysant la réaction de transcription inverse, du dithiothréitol stabilisant l'enzyme en solution et un tampon adapté pour l'activité de l'enzyme. Ce mix est pré-incubé 2 minutes à 42°C puis est ajouté à l'ARN. Le tout est homogénéisé et incubé dans un thermocycleur 1 heure à 42°C (activation de la transcriptase inverse) puis 3 minutes à 65°C (inactivation de l'enzyme). L'ADN complémentaire (ADNc) synthétisé est stocké à -20°C en attendant d'être utilisé pour la qPCR.

3. PCR quantitative

La technologie TaqMan[®] a été utilisée pour la qPCR. Cette technologie repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente, la sonde TaqMan[®] qui s'hybride spécifiquement à la région de l'ADN simple brin choisie pour être amplifiée par les amorces. Lorsque la Taq polymérase synthétise le brin complémentaire son activité exonucléase dégrade simultanément la sonde, relarguant le fluorophore et permettant l'expression de la fluorescence, qui est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le produit de qPCR. La qPCR a été réalisée suivant le protocole du fournisseur (*TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*). 50 ng d'ADNc ont été utilisés pour un volume final de 10 µL par réaction. Chaque échantillon est chargé en triplicat. Le milieu de réaction contient : les amorces TaqMan[®], le TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (il contient notamment l'Ampli Taq Gold[®] DNA Polymerase et les dNTPs), de l'eau sans RNase et l'ADNc. Les amorces suivantes ont été utilisées :

SUN2 : Rn01505183_m1 (Thermo Fisher Scientific)

GAPDH : Rn01775763_g1 (Thermo Fisher Scientific)

L'amplification a ensuite été réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems 7900HT) selon le programme suivant : 10 minutes à 95 °C (activation de la polymérase) suivies de 40 cycles de 15 secondes à 95°C (dénaturation de l'ADNc) et 1 minute à 60 °C (hybridation des sondes et élongation du brin complémentaire).

En posant l'hypothèse que l'efficacité d'amplification par les amorces des deux gènes était égale à 100% (les amorces TaqMan® sont garanties avec une efficacité d'amplification de 100%±10% par le fournisseur Thermo Fisher Scientific), nous avons déterminé les niveaux relatifs d'expression des ARNm par la méthode du $\Delta\Delta C_t$. Le C_t (threshold cycle) ou cycle seuil, représente le nombre de cycles requis pour que le signal fluorescent devienne significativement supérieur au bruit de fond, il apparaît au début de la phase exponentielle de la courbe d'amplification de l'ADN. Plus l'échantillon est concentré en ADNc cible à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point significativement supérieur au bruit de fond et donc moins la valeur du C_t sera élevée. À l'issue de la qPCR, les valeurs des C_t du gène de ménage *GAPDH* sont soustraites à celles du gène d'intérêt (ΔC_t) pour chaque échantillon, puis la moyenne des ΔC_t de la condition contrôle est alors réalisée puis soustraite à chaque ΔC_t ($\Delta\Delta C_t$), ce qui permet de calculer la valeur RQ ou Relative Quantification ($RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$), une valeur de $RQ > 1$ signifie que la quantité d'ARN dans la condition d'intérêt est plus importante que dans la condition contrôle (et à l'inverse $RQ < 1$ signifie que la quantité d'ARN dans la condition d'intérêt est moins importante que dans la condition contrôle).

IV. Immunofluorescence indirecte sur cellules fixées

1. Protocole expérimental

Pour l'analyse de l'**expression de SUN2** en fonction de la rigidité de la matrice, les cellules A7r5 ont été cultivées 24h dans des plaques 12 puits (50 000 cellules/puits) (Softslip 12™ Matrigen) recouvertes de gels de polyacrylamide de 1 et 50 kPa recouvertes de collagène I.

Pour le marquage des **adhérences**, des cellules A7r5 transfectées avec le siRNA contrôle et le siRNA SUN2 ont été cultivées pendant 16 heures sur des lamelles de verre placées dans des plaques 24 puits (20 000 cellules/puits) recouvertes avec de la fibronectine (référence FC010 Millipore™) à 40 µg/mL.

Pour le marquage de l'**actine corticale**, des cellules HeLa transfectées avec le siRNA contrôle et le siRNA SUN2 ont été cultivées 8 heures dans des plaques 12 puits

(50 000 cellules/puits) sur des lamelles de verre recouvertes avec de la fibronectine à 30 µg/mL, puis traitées avec 5 µM de STC pendant 16 heures.

Le marquage immunofluorescent se déroule comme suit pour chaque condition : les cellules sont lavées au PBS 1X pH 7,4 à 37°C puis fixées au paraformaldéhyde 4% 15 minutes à température ambiante. Trois lavages au PBS 1X pH 7,4 à température ambiante sont ensuite effectués suivis d'une perméabilisation de 15 minutes avec 0,1% de Triton X-100 dilué dans du PBS 1X. Les cellules sont à nouveau lavées 3 fois au PBS 1X pH 7,4 puis les sites aspécifiques sont bloqués 15 minutes avec de la BSA 1% diluée dans du PBS 1X 0,2% Tween (solution filtrée pour enlever les cristaux de BSA mal dilués). Les cellules sont ensuite mises à incuber avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage à 4°C toute la nuit en chambre humide ([Tableau IV](#)). Cinq lavages au PBS 1X pH 7,4 à température ambiante sont effectués, puis les cellules sont mises à incuber avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage pendant 45 minutes ([Tableau IV](#)). Cinq lavages au PBS 1X pH 7,4 à température ambiante sont effectués et les lamelles sont montées sur des lames avec du ProLong™ Diamond Antifade Mountant avec ou sans 4', 6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour marquer les noyaux.

Pour le marquage de **SUN2** et de l'actine (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin référence A12379 chez Thermo Fisher Scientific) les cellules ont été observées au microscope confocal Andromeda TILL-FEI (caméra EMCCD iXon 897 et objectif α -Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil Korr M27, WD 0,1 mm). L'acquisition des images a été effectuée à l'aide du logiciel LA, FEI et l'analyse avec les logiciels OA, FEI et ImageJ.

Les **adhérences** ont été marquées avec des anticorps anti-paxilline et anti-paxilline phosphorylée et les cellules ont été observées au microscope à fluorescence Nikon® Eclipse E600 (caméra Digital Sight DS-U3 Nikon® et objectif Plan-Apochromat 60x/1,40 Oil ∞ /0,17 WD 0,21). L'acquisition des images a été effectuée avec le logiciel NIS-Elements (Nikon®) et l'analyse avec le logiciel imageJ et le « Focal Adhesion Analysis Server » (Berginski and Gomez, 2013).

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés ci-dessous :

TABLEAU IV : Anticorps utilisés pour les marquages par immunofluorescence

Anticorps	Dilution	Référence	Fournisseur
Anti-SUN2	1/500	ab124916	abcam
Anti-Paxilline	1/250	ab3127	abcam
Anti-Phospho-Paxilline	1/50	#2541	Cell Signaling Technology®
Anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Variable en fonction de l'Ac primaire	A-11029	ThermoFisher Scientific
Anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568	Variable en fonction de l'Ac primaire	A-11036	ThermoFisher Scientific

L'actine corticale a été marquée par la phalloïdine (Texas Red™-X Phalloidin, référence T7471 chez Thermo Fisher Scientific), toxine liant l'actine filamenteuse conjuguée ici à un colorant à fluorescence rouge, le Texas Red®-X. Le marquage par la phalloïdine (diluée au 1/500^e) a été effectué de la même façon que le marquage avec un anticorps secondaire. Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal Andromeda TILL-FEI (caméra EMCCD iXon 897 et objectif α -Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil Korr M27, WD 0,1 mm). L'acquisition des images a été effectuée à l'aide du logiciel LA, FEI et l'analyse avec les logiciels OA, FEI et ImageJ.

2. Analyses

2.1 L'expression de SUN2

Lors de l'acquisition, plusieurs images ont été prises sur toute la hauteur de la cellule (une image tous les 0,2 μ m) permettant d'obtenir des stacks en 3D pour calculer le plus fidèlement possible l'expression de SUN2 dans chaque condition.

L'analyse de l'expression de SUN2 a été réalisée avec le logiciel ImageJ. La formule suivante a été utilisée pour soustraire le bruit de fond propre à chaque condition et ainsi obtenir l'intensité totale de fluorescence corrigée (Corrected Total Cell Fluorescence ou CTCF), méthode utilisée dans plusieurs publications (Gavet and

Pines, 2010; McCloy et al., 2014). Nous avons ici adapté la méthode au noyau en calculant la « Corrected Total Nuclear Fluorescence » (CTNF) :

$$\text{CTNF} = \text{Densité intégrée} - (\text{Aire du noyau} * \text{Moyenne de la fluorescence du bruit de fond})$$

2.2 L'actine corticale

Pour chaque condition, les images ont été prises en se plaçant sur le plan correspondant au diamètre maximum de la cellule. L'analyse a été effectuée avec le logiciel ImageJ, en traçant une diagonale au centre de la cellule (la diagonale est toujours tracée de la même façon pour toutes les cellules) permettant d'obtenir le ratio suivant :

$$\text{Ratio} = \frac{\text{intensité maximale de fluorescence au niveau du cortex}}{\text{moyenne de l'intensité de fluorescence du cytoplasme}}$$

2.3 Les adhérences

L'analyse du nombre et de la morphologie des adhérences (longueur et aire) a été réalisée avec le « Focal Adhesion Analysis Server » (Berginski and Gomez, 2013). Pour chaque cellule, le ratio Phospho-paxilline/Paxilline a ensuite été calculé.

V. Vidéomicroscopie

La vidéomicroscopie permet d'observer le comportement et l'activité cellulaire en temps réel sur des cinétiques de plusieurs heures voire plusieurs jours. C'est donc un outil indispensable pour étudier un processus dynamique tel que la mitose. Une enceinte entourant le microscope permet de contrôler les paramètres environnementaux nécessaires à la vie des cellules pendant le temps de l'expérience (37°C et 5% de CO₂). Ce dispositif est adaptable sur plusieurs types de microscopes. Nous avons utilisé un microscope à contraste de phase pour calculer la durée totale de la mitose des cellules A7r5, des cellules HeLa et des MEF ainsi qu'un microscope

confocal en mode spinning disk pour déterminer plus précisément la durée des phases de la mitose dans des cellules HeLa Kyoto EGFP- α -tubulin/H2B-mCherry.

1. Microscopie à contraste de phase

L'acquisition des images a été effectuée avec le microscope inversé Zeiss AxioObserver Z1 (objectif Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 et caméra CoolSnap CCD) associé au logiciel Zen Blue. Afin de calculer la durée de la mitose, des images ont été prises toutes les 2 minutes pendant un minimum de 20 heures afin de collecter un nombre suffisant d'évènements pour chaque condition.

Les vidéos ont ensuite été montées avec le logiciel ImageJ et la durée de la mitose a été calculée (temps entre le début de l'arrondissement cellulaire et le début du ré-étalement post-mitotique).

2. Microscopie confocale spinning disk

2.1 Réglages utilisés

En utilisant le microscope confocal Spinning Disk Andromeda, TILL-FEI (caméra EMCCD iXon 897 et objectif Plan-Apochromat 20x/0,75, WD 610) couplé à une enceinte de vidéomicroscopie, nous avons pu observer le déroulement des phases la mitose des cellules HeLa Kyoto EGFP- α -tubulin/H2B-mCherry, en prenant des images par intervalles de 2,5 minutes sur des temps d'acquisition de 15 heures. La quantification de la durée des phases de la mitose nécessite de courts intervalles entre les prises de vue, les transitions entre les phases étant très rapides. Cependant, la prise répétée d'images à intervalles très courts favorise l'induction d'un photoblanchiment et d'une phototoxicité cellulaire. La puissance des lasers a donc été réglée au minimum (laser 488 nm : 10% ; laser 561 nm : 10%) pour limiter ces phénomènes.

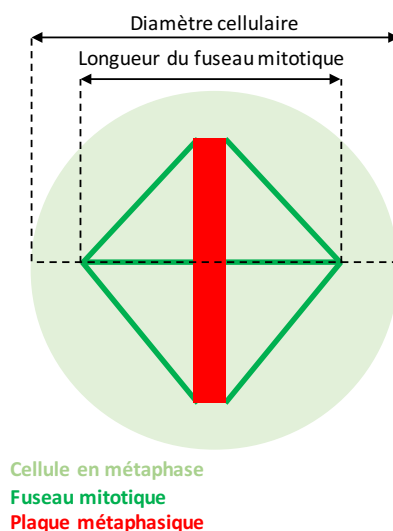
L'acquisition des images a été effectuée avec le logiciel LA, FEI et l'analyse avec les logiciels OA, FEI et ImageJ.

La durée des phases de la mitose a été calculée de la façon suivante : la durée de la prométaphase correspond à l'intervalle de temps entre le moment où les microtubules sont attachés aux kinétochores jusqu'au plan précédant l'alignement de tous les chromosomes à la plaque équatoriale. La durée de la métaphase correspond au temps durant lequel les chromosomes sont alignés au niveau de la plaque équatoriale. L'anaphase démarre à la séparation des chromatides sœurs et prend fin au plan précédant la décondensation des chromosomes. Le temps entre la décondensation des chromosomes et le début du ré-étalement cellulaire correspond à la télophase/cytokinèse. Il convient de noter que la quantification de la durée des phases est basée uniquement sur l'observation des événements visibles grâce aux marquages de la tubuline et de l'histone H2B. De plus, malgré un intervalle de temps court entre les prises (2,5 minutes), certaines transitions entre les phases peuvent parfois avoir été manquées. Cependant, les conditions siRNA contrôle et siRNA SUN2 ont été quantifiées exactement de la même façon.

2.2 Analyse de la longueur du fuseau mitotique et du diamètre cellulaire

La longueur du fuseau mitotique a été déterminée sur toute la durée de la métaphase à l'aide d'une macro (ImageJ). Celle-ci calcule pour chaque cellule la distance entre les deux centrosomes, dont la position est définie par l'utilisateur, sur la série d'images correspondant à la métaphase. Cela permet ensuite de calculer la longueur moyenne du fuseau mitotique au cours de la métaphase.

Le diamètre cellulaire a également été déterminé à l'aide d'une macro (ImageJ) sur des images fixes choisies arbitrairement parmi la série d'images correspondant à la métaphase. La macro calcule le diamètre en traçant une droite qui passe par les deux centrosomes ([Figure 40](#)).



**FIGURE 40 : DÉFINITION DU DIAMÈTRE CELLULAIRE ET DE LA LONGUEUR DU FUSEAU MITOTIQUE
DANS UNE CELLULE EN MÉTAPHASE**

VI. Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM), largement utilisé dans le contexte de la mitose, a permis de mettre en évidence les forces mises en jeu lors de l'arrondissement de la cellule. Le microscope se compose d'un levier ou « cantilever », sur lequel un rayon laser se réfléchit. Les déflexions du levier sont captées par un photodétecteur et transmises à un ordinateur.

En positionnant le levier sur l'échantillon cellulaire, il est ainsi possible de mesurer différents paramètres, dont la hauteur de la cellule, sa rigidité et les forces exercées par la cellule sur le levier (Figure 41).

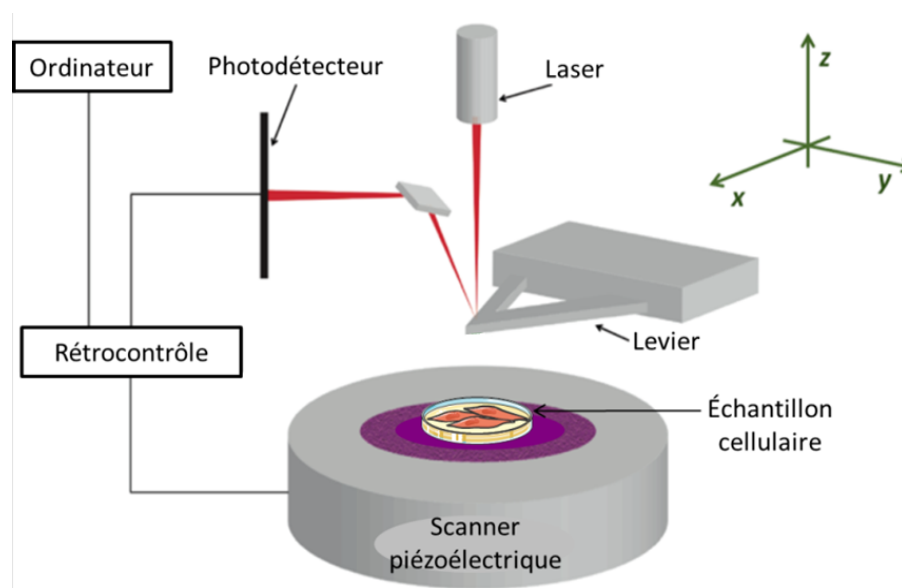


FIGURE 41 : MICROSCOPE À FORCE ATOMIQUE

(d'après un schéma d'Amy Hall, Université de Sheffield)

Afin de mesurer la tension corticale exercée par les cellules en mitose, nous avons utilisé un protocole développé par l'équipe de Daniel Müller (Stewart et al., 2011b). Les cellules ont été préalablement synchronisées en prométaphase en les traitant avec 5 μM de STC pendant 16 heures. Les mesures ont ensuite été effectuées sur des cellules isolées.

Le microscope à force atomique JPK Instruments AG associé au module CellHesion® et monté sur un microscope optique (Olympus) a été utilisé pour les mesures de forces. Pour garder nos cellules dans des conditions physiologiques le temps des expériences, un système de chauffage à 37°C au niveau de la boîte de culture a été utilisé et le milieu de culture a été tamponné par l'ajout de 20 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES). Des leviers sans pointe (CSC37/tipless de chez Mikromasch - raideur 0.3 N m^{-1}) ont été utilisés et calibrés selon la méthode du bruit thermique (Hutter and Bechhoefer, 1993).

Après une phase d'approche sur la surface adjacente à la cellule, le levier a été positionné sur la cellule à une hauteur de 8 μm par rapport au substrat. La mesure des forces a été enregistrée pendant 180 secondes à hauteur constante (Figure 42).

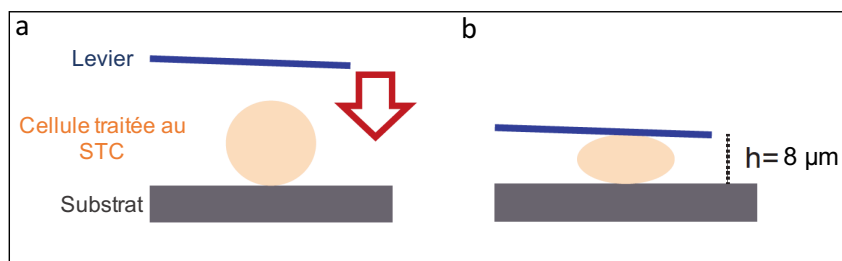


FIGURE 42 : MESURE DES FORCES EXERCÉES PAR UNE CELLULE EN PROMÉTAPHASE PAR L'AFM

a. Le levier est positionné au-dessus de la cellule de telle sorte qu'au départ, la cellule et le levier ne sont pas en contact. Puis le levier descend progressivement vers la cellule lors d'une phase d'approche (flèche rouge) b. Le levier est ensuite mis en contact avec la surface cellulaire à une hauteur constante de $8 \mu\text{m}$ par rapport au substrat de culture. Les forces exercées par la cellule sur le levier sont alors mesurées.

Les forces mesurées se décomposent en un pic transitoire qui suit l'approche du levier et une force persistante qui reste stable pendant plusieurs minutes (Figure 43).

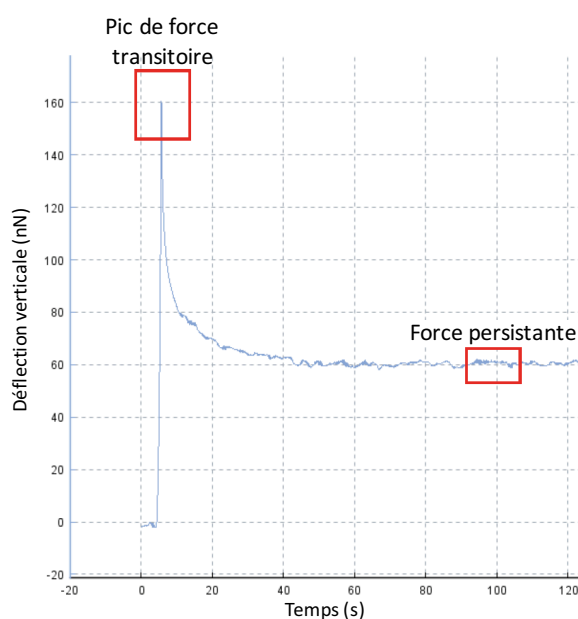


FIGURE 43 : COURBE DES FORCES EXERCÉES PAR LA CELLULE EN PROMÉTAPHASE

Les déflexions verticales du levier, correspondant aux forces exercées par la cellule sont mesurées en nN en fonction du temps (secondes). Un premier pic de force transitoire est observé lorsque le levier entre en contact avec la surface cellulaire puis les forces exercées par la cellule demeurent constantes (force persistance) pendant la durée de la mesure.

VII. Tests statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) accompagnés du nombre de répétitions par groupe ou échantillon (n). La significativité des résultats est évaluée par le test statistique correspondant indiqué (des tests T de Student non-appariés ont été effectués sauf indication contraire) : seules les probabilités inférieures à 5% ($p < 0,05$) sont considérées comme significatives. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®].

RÉSULTATS

ARTICLE n°1

SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity

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

(Lettre soumise dans Nature Cell Biology)

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

SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity

Nejma Belaadi¹, Lydia Pernet², Julien Aureille², Gilliane Chadeuf¹, Marc Rio¹, Luan Nguyen³, Nathalie Vaillant¹, Guy Louarn³, Elisa Vitiello⁴, Gervaise Loirand¹ and Christophe Guilluy^{2#}

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

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

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

⁴ *Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR CNRS 5588, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France*

#Correspondence to: Christophe Guilluy at christophe.guilluy@inserm.fr

How cells adjust their growth to the mechanical properties of their surrounding environment is central to many aspects of biology. During interphase, changes in extracellular matrix (ECM) rigidity affect gene expression and cell cycle progression¹, which can compromise tissue homeostasis². Here we examined the effect of extracellular matrix rigidity on cell division. We found that cells divide more rapidly when cultured on rigid substrate. Surprisingly, we observed no effect of extracellular matrix rigidity on rounding or post-mitotic spreading duration, but instead we found that changes in matrix stiffness impact metaphase to anaphase transition. We next compared the proteomic content of cells dividing on soft and stiff substrates and we found that ECM rigidity regulates the stability of the LINC complex component SUN2, whose level of expression affects mitotic progression. On rigid substrates high level of SUN2 promotes FHOD1 activation, which in turn favors cortical actin recruitment, force generation and mitotic progression, while low level of SUN2 delays the onset of anaphase when cells are grown on soft extracellular matrix.

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

As cells progress in mitosis, they drastically change their shape in order to accommodate the cellular machinery and allow chromosome segregation. These changes are associated with adhesion disassembly as cells enter prophase³. Since ECM rigidity affects integrin-based adhesion maturation, we determined if ECM rigidity impacts de-adhesion duration. We measured the elapsed time from initial retraction of the cell margin to complete rounding, and we did not observe any difference whether cells were cultured on soft or stiff ECM (Fig. 1d, e). Similarly we observed no difference in post-mitotic spreading, which started less than 5 min following anaphase regardless of the ECM stiffness (Fig. 1a). Next, we investigated whether changes in ECM rigidity regulate the progression of specific stages of cell division. We fixed actively dividing cells and quantified the percentage of cells undergoing respectively prophase, metaphase, anaphase or telophase. We observed an increased proportion of cells in metaphase when cells were cultured on softer ECM (Fig. 1f), suggesting that low ECM stiffness may cause a metaphase defect or delay.

Force-bearing elements that transmit and/or transduce mechanical stress have been shown to play a key role in mediating the effect of ECM rigidity on cell behavior⁴. To understand the molecular process that regulates mitosis duration in response to changes in ECM rigidity, we compared the detergent-insoluble proteomic content of smooth muscle cells cultured on soft or

stiff ECM using label-free mass spectrometry (Fig 2a). Besides difference in adhesion protein expression and matrix protein expression, we observed a change in SUN2 expression between soft and stiff ECM. SUN2 is an inner nuclear membrane that belongs to the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex and interacts with nesprin to connect the cytoskeleton to the lamina. We found that cells express an increased amount of SUN2 when plated on more rigid ECM (Fig. 2-b, c, d). This is consistent with recent work reporting that the levels of expression of some nucleoskeletal proteins, including SUN2 and lamin A/C, increase with tissue elasticity⁵. We next looked at mitosis duration in cells depleted for SUN2 and found that SUN2 depletion caused a significant increase in mitosis duration (Fig. 2e), whereas SUN1 depletion had no effect on mitosis progression (Supplementary Fig. 1b). Interestingly, cells depleted for SUN2 and plated on 50 kPa ECM completed mitosis in an average duration similar to cells transfected with control siRNA and plated on 1 kPa (Fig. 2f), indicating that SUN2 participates to the effect of ECM rigidity on mitosis duration.

We next explored if this increase in SUN2 expression was the consequence of an increase in *SUN2* transcription or a decrease in SUN2 protein degradation. Using real-time quantitative PCR (qPCR), we examined *SUN2* mRNA expression and we observed no significant changes in response to ECM rigidity (Figure 2g). To investigate SUN2 degradation, we blocked protein synthesis using cycloheximide (CHX) and we analyzed SUN2 expression using immunofluorescence (Fig. 2h) and western blot (Supplementary Fig. 1c). Following CHX treatment, SUN2 expression diminution was reduced when cells were cultured on rigid substrate (Fig. 2h, i), indicating that SUN2 stability increases with ECM rigidity. It has been proposed that SUN2 targeting to the inner nuclear membrane (INM) follows a diffusion-retention model⁶. According to this model, INM proteins distribute by free diffusion within the continuous membranes of the endoplasmic reticulum, outer nuclear membrane (ONM) and INM, where they accumulate depending on their interactions with local protein partners. Interestingly, cells display an increase number of perinuclear actin filaments when they adhere to rigid surfaces⁷. These actin

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

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

This is consistent with the increased proportion of cells undergoing metaphase observed when cells are cultured on soft ECM (Fig. 1f) and display low levels of SUN2 expression (Fig. 2h, i). In addition to the anaphase onset delay, we observed an increased length of the mitotic spindle in cells transfected with SUN2 siRNA (Fig. 3c, d). Mitotic spindle length is regulated by many factors including microtubule dynamic and cell shape⁸⁻¹⁰. Interestingly, we found that SUN2 depletion caused a significant increase in cell diameter (Fig. 3c, e). Cell shape in metaphase results from the actin cortex formation and increase in cell volume that occur during prophase and prometaphase¹¹. To probe the cell cortex, we used atomic force microscopy (AFM) and we measured force production under confinement (at constant height) of cells arrested in prometaphase using the Eg5 inhibitor STC, as previously described by others^{12,13}. Similar to previous reports^{13,14}, we observed an initial transient peak force that follows the cantilever approach and a persistent force that remains stable over minutes (Supplementary Fig. 2a, b). We found that SUN2 depletion caused a decrease in both transient peak and persistent force (Fig. 3f), indicating that cortical tension is altered. Others have demonstrated that cortical actin contribute to force production under confinement in prometaphase and defects in actin recruitment or polymerization drastically impact cortical tension¹²⁻¹⁴. To explore how SUN2 can regulate force production, we made confocal imaging of cells arrested in prometaphase. Consistent with the force measurement, we observed that actin recruitment at the cortex was decreased in cells depleted for SUN2 (Fig. 4a, b). Actin and microtubules interact at the cortex during metaphase^{10,15} and alteration in cortex mechanical properties or polarity have been shown to

impact spindle formation and positioning^{16–19}. Interestingly, previous work has demonstrated that cortical actin defects during metaphase delay the onset of anaphase in yeast^{20,21} and in animal cells^{16,17}. This indicates that the delay in metaphase to anaphase transition induced by SUN2 depletion may be the consequence of the cortex alteration and mitotic spindle defects. Whereas previous work showed that co-depletion of SUN1 and SUN2 delayed the removal of membranes from chromatin, we did not observe this effect in cells that were only depleted for SUN2²². The authors also reported mitotic spindle defects in double knockdown cells²², which are consistent with the defects observed in SUN2 depleted cells here. This suggests that SUN1 and SUN2 may have partially redundant roles during mitosis, as it has been observed during other cellular processes^{23,24}. However we cannot rule out that SUN2 regulates mitotic progression through additional mechanisms.

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

Interestingly, the LINC complex has been shown to interact with the formin FHOD1²⁶, whose activity can be altered in cells displaying nucleoskeletal defects²⁷. To investigate FHOD1 activity, we analyzed its phosphorylation on Thre 1141 in cells respectively in interphase and in prometaphase. Strikingly, we observed that FHOD1 is activated in prometaphase (Fig. 4d) and SUN2 depletion prevented mitosis-dependent FHOD1 activation. We next analyzed the effect of FHOD1 depletion on force production and mitosis duration. We found that, FHOD1 knockdown

cells, like SUN2 depleted cells, generated less force during prometaphase (Fig. 4e) and completed mitosis in longer time (Fig. 4f). Another formin, diaphanous-related formin 1 (DIAPH1) was proposed to participate to cortex formation¹³. Interestingly, the formin inhibitor has a drastic effect on force production, compared to FHOD1 depletion (Fig. 4e) or DIAPH1 depletion¹³, which suggests that distinct formins are involved in cortical actin polymerization in mitotic cells. FHOD1 has been shown to participate to adhesion maturation²⁸ during interphase, however we observed that Sun2 depletion did not affect adhesion number (Fig. 4g, h), maturation (Supplementary Fig. 3b) and cell area (Fig 4i). This suggests that SUN2 participates to mitosis-dependent FHOD1 activation, but has little impact on FHOD1 activity during interphase, as demonstrated by the absence of effect of SUN2 depletion on FHOD1 phosphorylation in interphase (Fig. 4d). FHOD1 interacts with the LINC complex together with perinuclear actin filaments²⁶. This perinuclear localization may be crucial for FHOD1 activation as cells enter mitosis. On rigid substrates, high levels of SUN2 may act as scaffold and favor FHOD1 activation. Interestingly, FHOD1 expression is increased in melanomas^{29,30} and its inhibition decreases proliferation and tumor growth³⁰.

Our results reveal a molecular mechanism which controls mitotic progression in response to changes in tissue mechanics. We found that ECM rigidity regulates SUN2 stability, which in turn impacts mitotic progression. When cells adhere to stiff ECM, high levels of SUN2 expression promote actin cortex formation and faster metaphase to anaphase transition. This mechanism may be important when cells are surrounded by stiff microenvironment. Interestingly, SUN2 protein expression correlates with tissue elasticity *in vivo*⁵. High levels of SUN2 may help consolidating the cortex *via* FHOD1 to act against confinement and allow chromosome segregation. The changes in cell volume that occur during mitosis have been suggested to be sufficient to push a rigid microenvironment, independently of the actin cortex³¹. However a tensed and solid actin cortex may be crucial for mitotic spindle formation to perform mitosis in timely fashion, as it is needed to enable unperturbed spindle morphogenesis when cells are confined within rigid microenvironment³².

ACKNOWLEDGEMENTS:

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

AUTHOR INFORMATION:

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

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

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

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

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

Figure 3 – SUN2 depletion causes cortical defects in metaphase

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

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

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

Methods

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

siRNA. Cells were transfected using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with the corresponding siRNA: *Silencer*™ Negative Control No. 1 siRNA (Ambion™ AM4611); siRNA targeting: SUN2 (rat) were from Invitrogen (Unc84bRSS342353); SUN2 (human) were from SIGMA (SASI_Hs01_00176980); SUN1 (human) were from SIGMA (SASI_Hs01_00032809); FHOD1 (human) were from eurogentec (AGA-CCA-GGA-CAU-GCU-GAA).

Microscopy. For phase-contrast microscopy, live-cell imaging was performed using a Zeiss AxioObserver Z1 (objective Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 with CoolSnap CCD camera) equipped with a temperature- and CO₂-controlled incubator box (37°C and 5% CO₂) and an image was taken every 2 minutes.

Mitotic duration was measured as the elapsed time between the onset of rounding to the first image demonstrating cytokinesis and post-mitotic spreading. Live-cell confocal imaging was performed using a Spinning Disk Andromeda, TILL-FEI (EMCCD iXon 897 camera with Plan-Apochromat 20x/0,75, WD 610 objective) equipped with a temperature and CO₂-controlled incubator box (37°C and 5% CO₂). For SUN2 fluorescent intensity analysis, corrected total nuclear fluorescence (CTNF) was calculated following this formula:

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

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

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

qPCR with reverse transcription. Total RNA was purified from cells using TRIzol[®] Reagent (MAN0001271 Ambion[™], Thermo Fisher Scientific) and RNAqueous-Micro kit (Ambion-Life technologies) according to the manufacturer's instructions. RNA (1 µg) was reverse-transcribed into cDNA. Quantitative real-time PCR was conducted on the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and TaqMan[®] primers/probes for *SUN2* : Rn01505183_m1 ; *GAPDH* : Rn01775763_g1 according to the manufacturer's recommendations. Expression data were normalized to a standard curve generated from a pool of control cells. *GAPDH* was used as the reference gene.

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

References

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

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

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

Figure 1

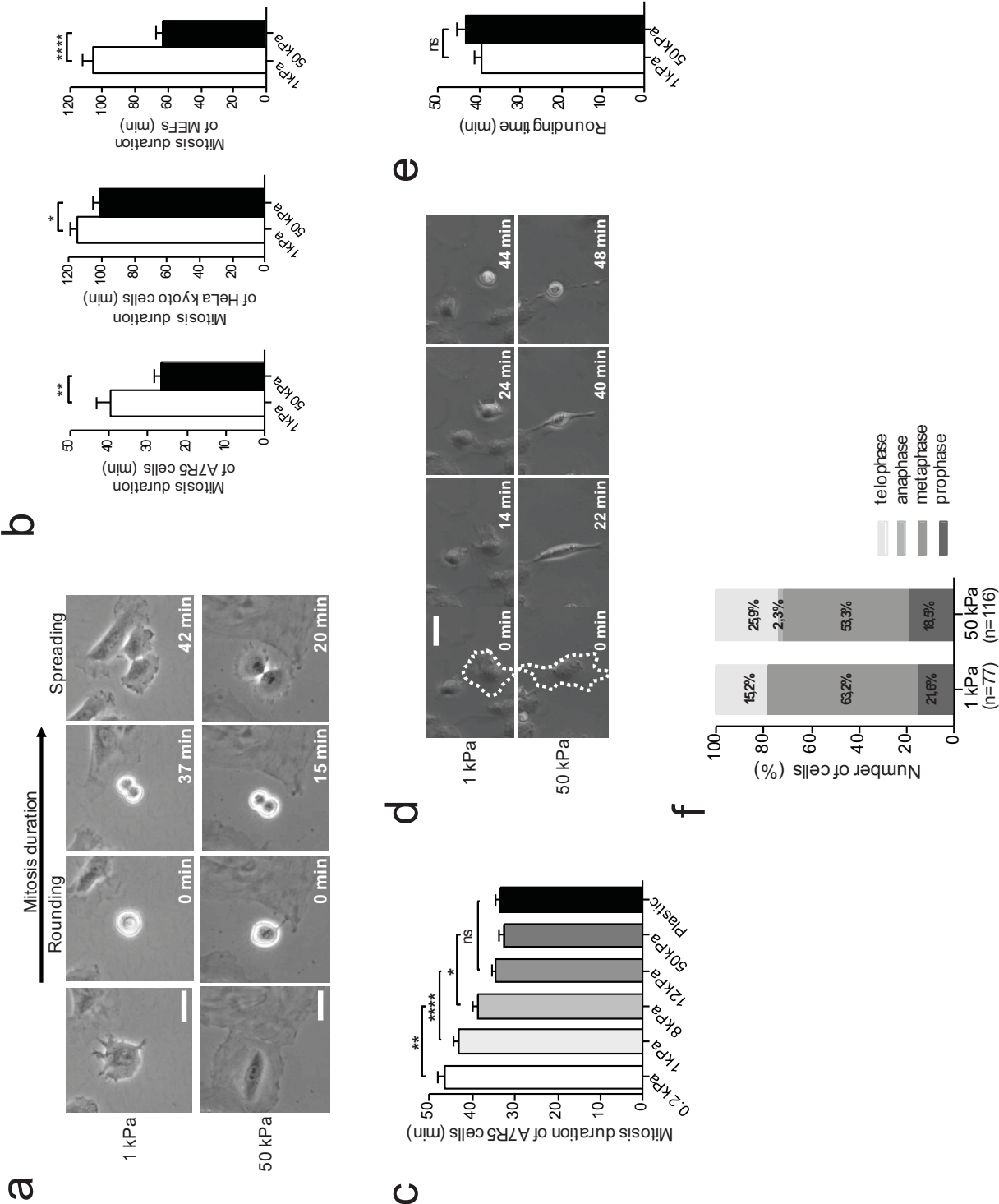


Figure 2

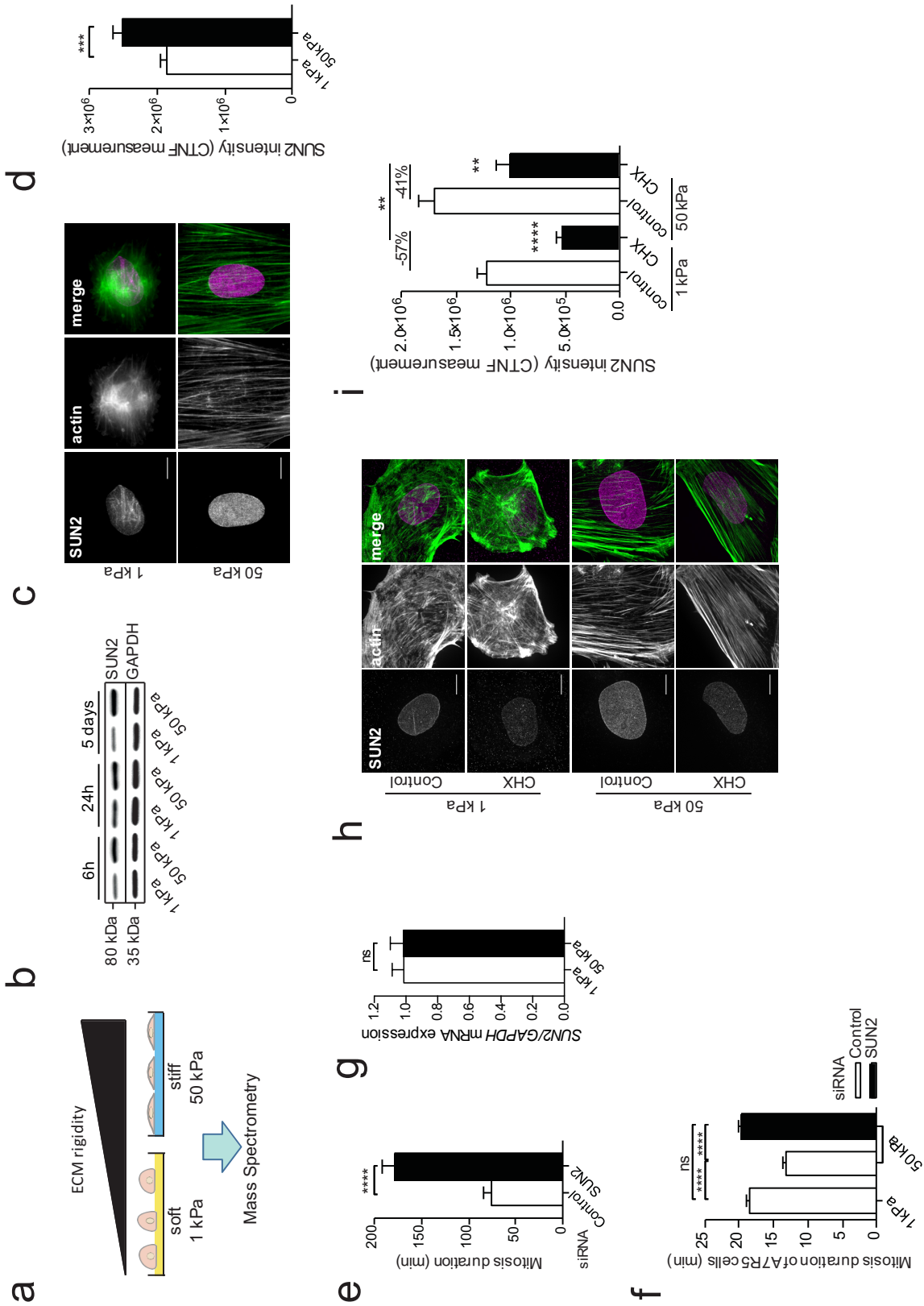


Figure 3

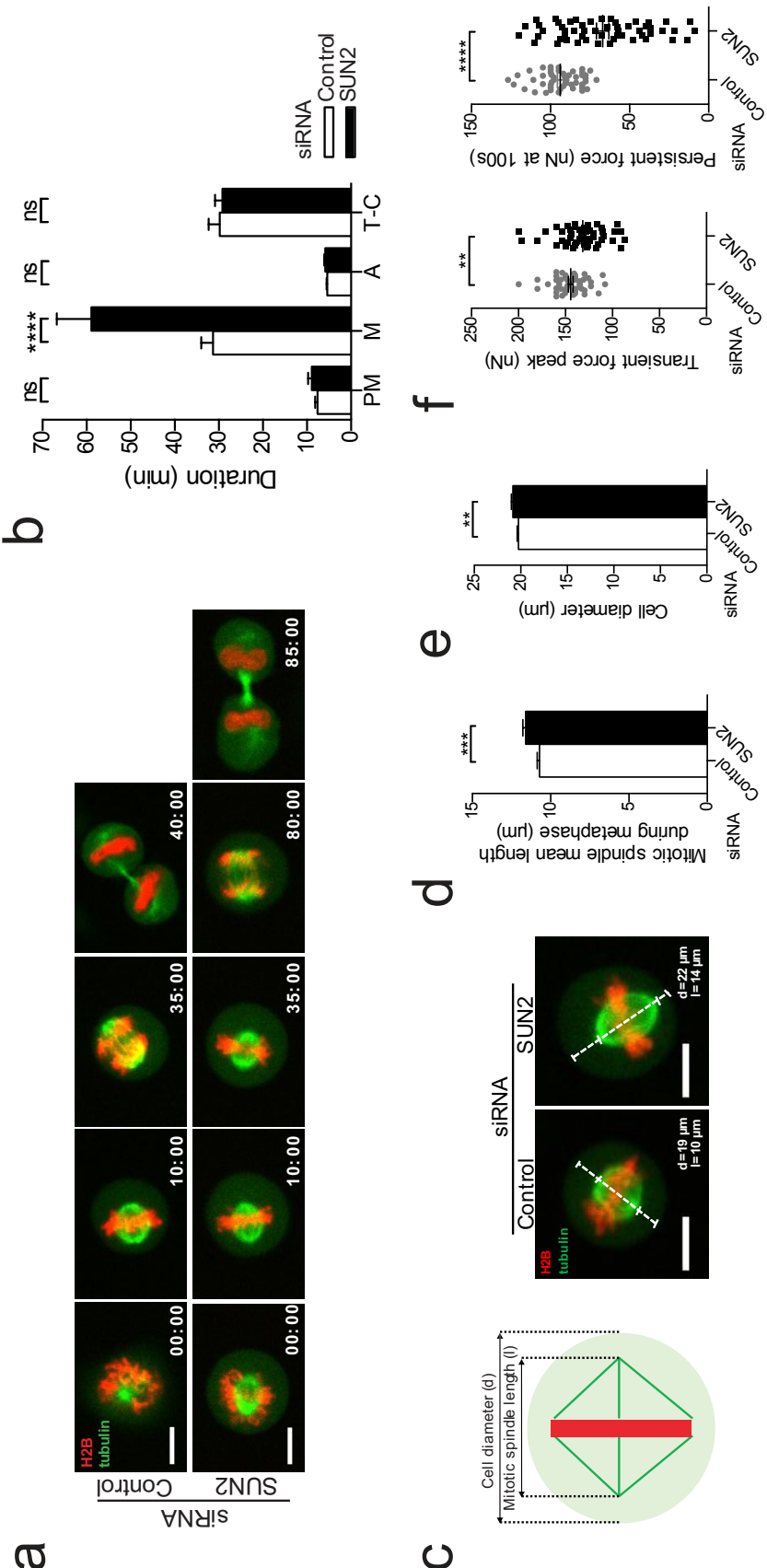
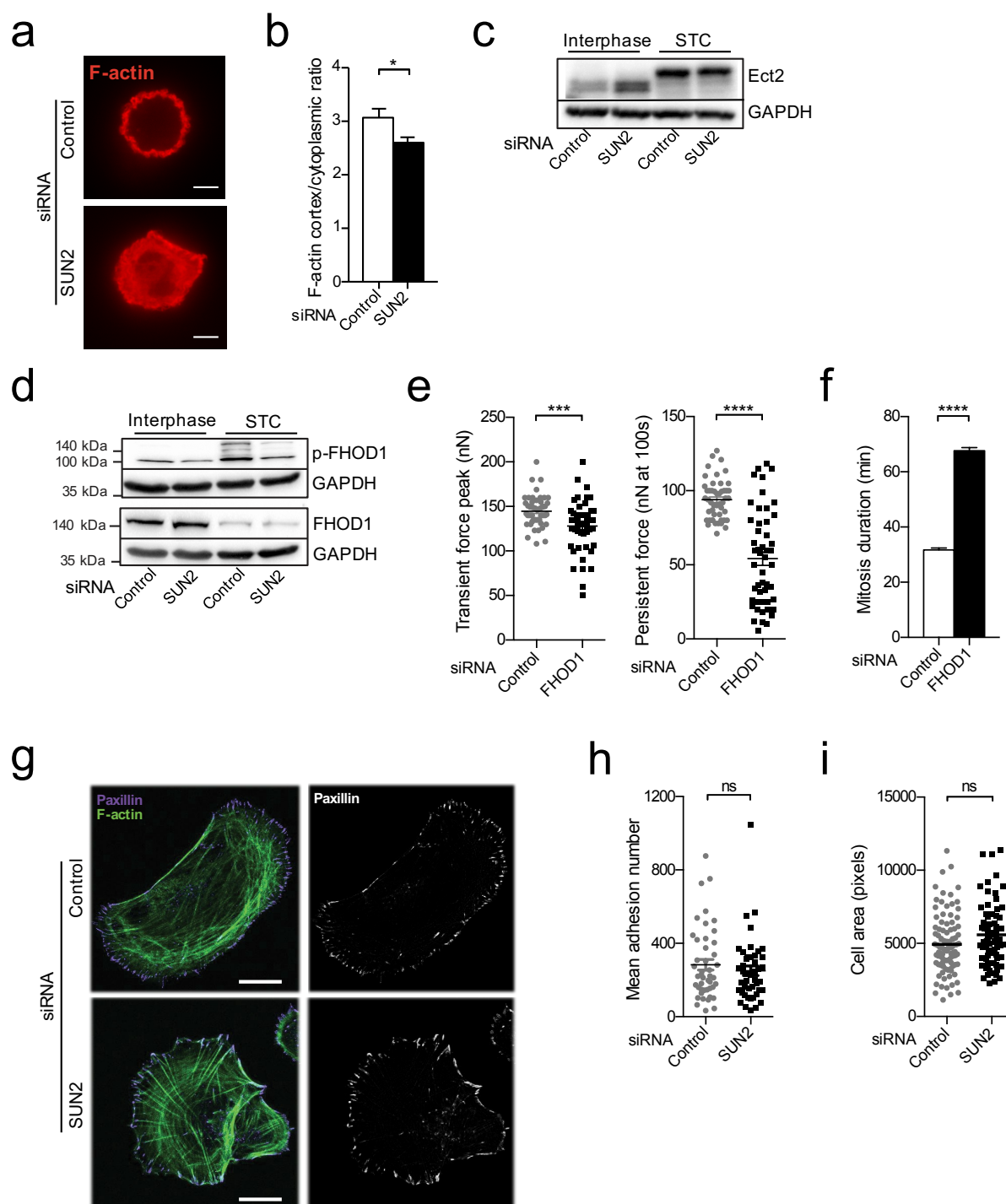


Figure 4



Supplementary figures legends

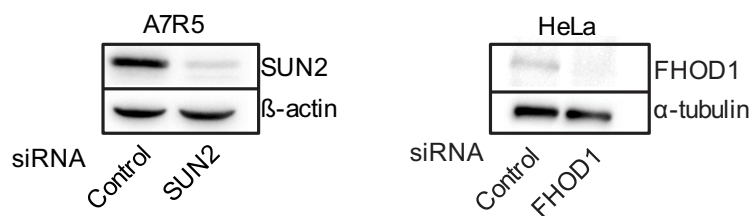
Supplementary Figure 1 – (a) SUN2 and FHOD1 knockdown efficiency was assessed by western blot, here are shown two examples in A7R5 cells and HeLa cells respectively (b) HeLa cells depleted for SUN1 were cultured on plastic and mitosis duration was measured using phase-contrast microscopy (c) SUN2 degradation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

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

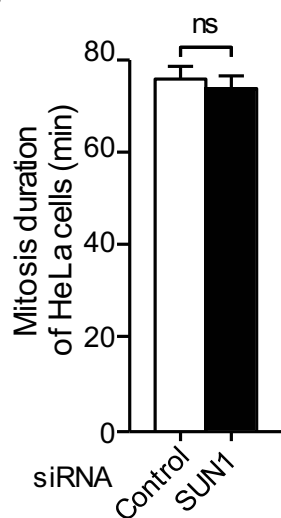
Supplementary Figure 3 – (a) Rock activity assay was performed on HeLa cells transfected with control siRNA and depleted for SUN2 and treated with STC (5 μM) (b) A7R5 cells transfected with control siRNA or depleted for SUN2 were plated during 16 hours on coverslips coated with fibronectin (40 $\mu\text{g/mL}$),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

Supplementary Fig. 1

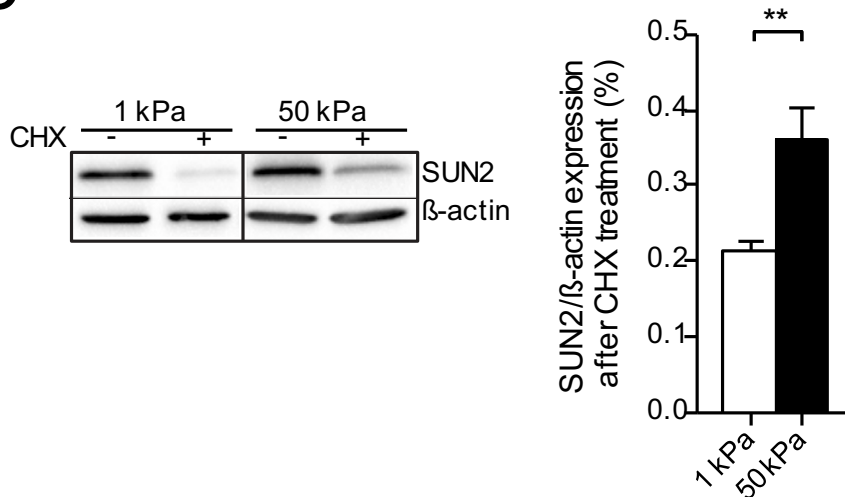
a



b

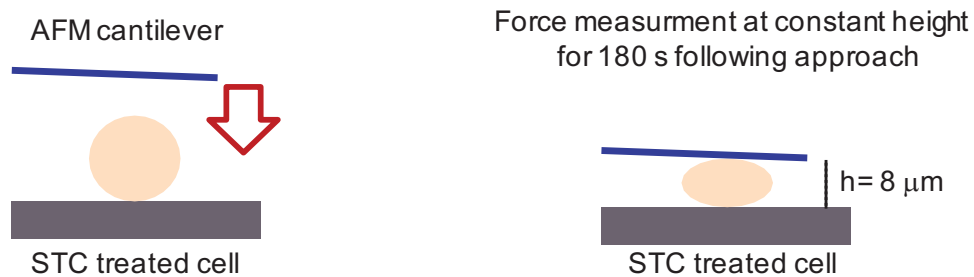


c

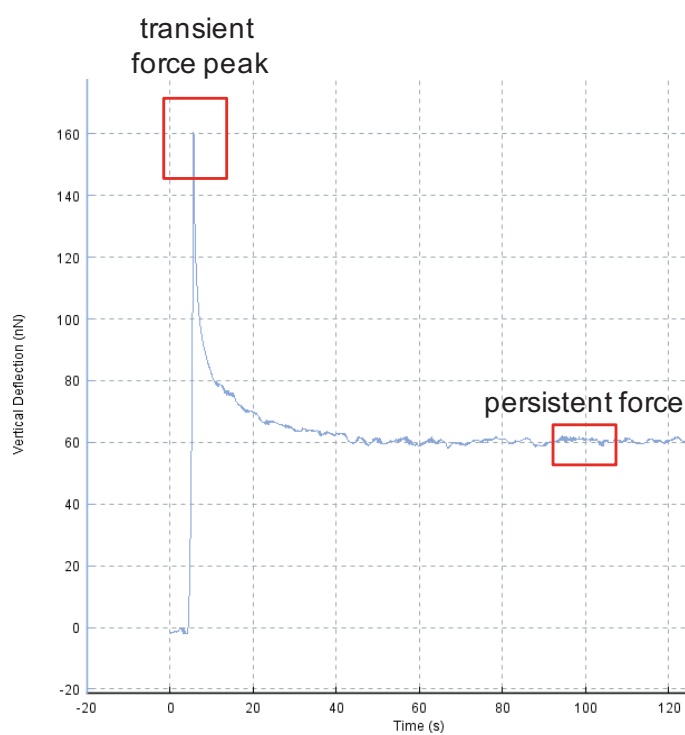


Supplementary Fig. 2

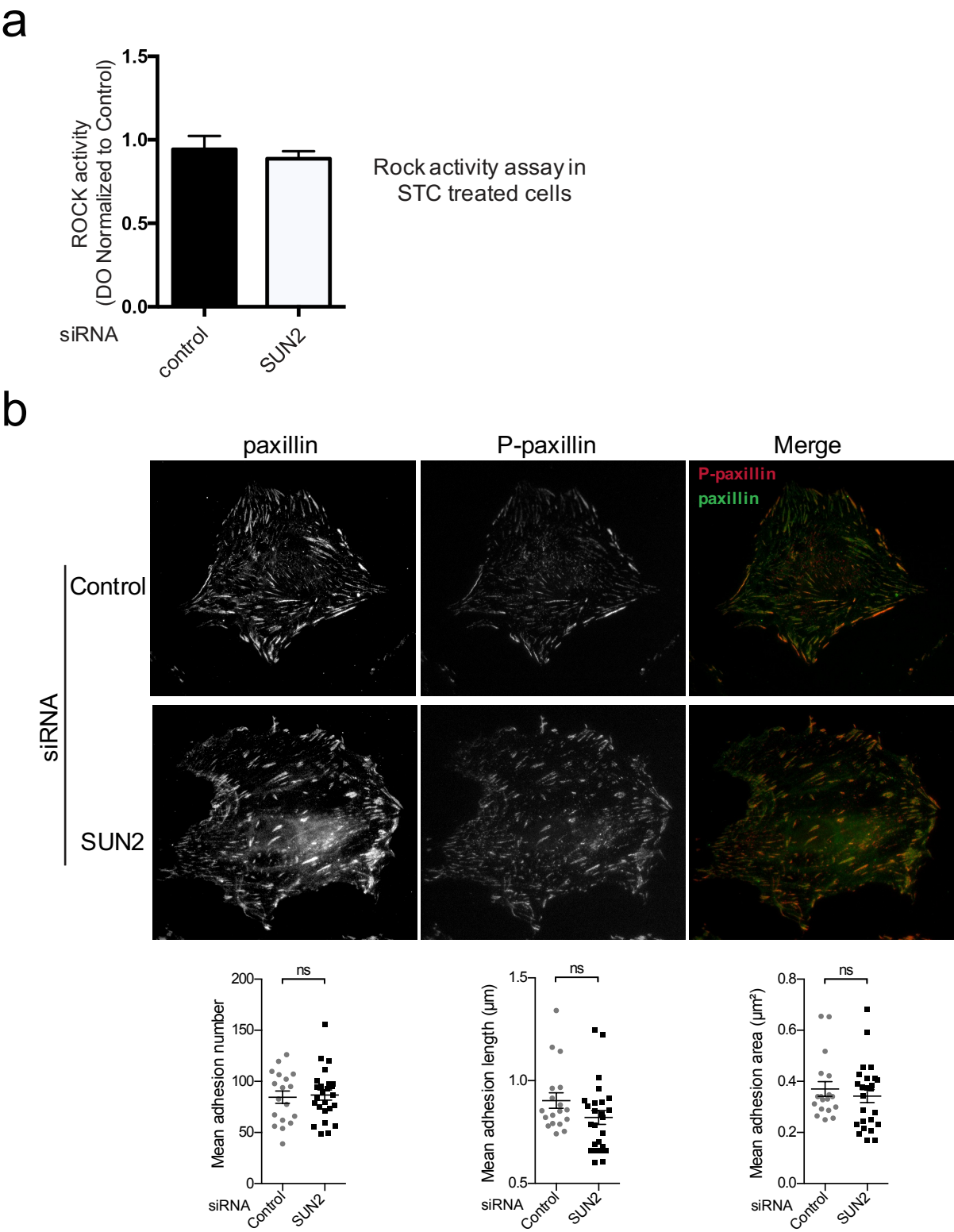
a



b



Supplementary Fig. 3



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les propriétés mécaniques de la MEC, plus particulièrement sa rigidité, exercent une régulation importante sur de multiples fonctions cellulaires dont la prolifération. *In vivo*, de nombreuses situations caractérisées par une rigidification excessive de la MEC comme le vieillissement de la paroi vasculaire ou la fibrose sont associées à une prolifération cellulaire excessive, pouvant conduire au développement de maladies telles que le cancer ou l'hypertension. Les travaux fondateurs de Judah Folkman et Anne Moscona ont montré que les cellules prolifèrent davantage lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice rigide (Folkman and Moscona, 1978). D'autres études ont plus tard confirmé cet effet en montrant que la rigidité de la MEC favorise la progression du cycle cellulaire, notamment la transition G1/S (Klein et al., 2009) et permet d'activer la transcription de gènes induisant la prolifération (Dupont et al., 2011). Cependant, l'effet de la rigidité sur la division cellulaire proprement dite, la mitose, n'a pas encore été élucidé. Nous nous sommes donc intéressés au contrôle de la progression mitotique par la rigidité de la MEC.

➤ La rigidité de la MEC favorise la progression mitotique et stabilise SUN2

La rigidité de la MEC régule la progression mitotique

Dans un premier temps, afin d'observer l'effet de la rigidité de la MEC sur la progression mitotique nous avons cultivé des CMLs de rat, des fibroblastes de souris et des cellules HeLa sur des gels de polyacrylamide dits souples (1 kPa) et rigides (50 kPa) et calculé la durée des mitoses. Nous avons alors montré et ce pour les trois types cellulaires, que les cellules cultivées sur une matrice rigide se divisent significativement plus vite. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois à notre connaissance, que la rigidité de la MEC affecte directement la progression mitotique. De façon intéressante, la durée de la mitose diminue graduellement lorsque la rigidité augmente et atteint un plateau à 12 kPa. En interphase, la rigidité cellulaire augmente en réponse à la rigidité de la MEC puis atteint un plateau lorsque la rigidité de la MEC est égale à environ 20 kPa (Tee et al., 2011). Cette limite représente

probablement la rigidité maximale que la cellule peut générer en réponse à la rigidité de la MEC. De la même façon, la durée de la mitose observée pour les cellules cultivées sur des substrats de 12 kPa, pourrait représenter la vitesse maximale à laquelle les cellules peuvent se diviser. À l'inverse, la vitesse de migration cellulaire suit une courbe de Gauss, elle augmente puis diminue avec la rigidité de la MEC (Peyton and Putnam, 2005). Cet effet est probablement lié à stabilité des adhérences, devenant trop importante, ce qui réduit alors la vitesse de migration. Le plateau que nous observons pourrait donc être la conséquence d'une saturation des mécanismes de division, ayant atteint une vitesse maximale ou bien la conséquence d'une saturation des systèmes de mécano-sensibilité de la rigidité, les adhérences et le cytosquelette.

À l'entrée en mitose, les cellules s'arrondissent et perdent leur adhérence avec le substrat. La rigidité de la MEC affectant la maturation des adhérences (Pelham and Wang, 1997), nous avons calculé le temps de dé-adhérence et n'avons observé aucune différence entre des cellules cultivées sur des substrats souples et rigides. Afin de mieux comprendre l'effet de la rigidité de la MEC sur la mitose, nous avons ensuite calculé la proportion de cellules se trouvant dans les différentes phases de la mitose à un temps donné sur des matrices souples et rigides. Nous avons alors observé que sur une matrice souple le nombre de cellules en métaphase est plus important. Ce résultat suggérant l'implication de la rigidité de la MEC sur la métaphase, nous avons donc cherché à caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de ce processus.

L'expression et la stabilité de SUN2 augmentent avec la rigidité de la MEC

Une analyse protéomique par spectrométrie de masse, nous a permis d'identifier la protéine SUN2, qui présentait une expression différentielle en fonction de la rigidité de la MEC. Outre SUN2, nous avons également identifié des protéines d'adhérence (protocadhérines) et des protéines de la MEC (LOX), cependant, n'ayant pas observé de modifications de l'adhérence ou du ré-étalement nous avons focalisé notre étude sur SUN2.

Nous avons d'abord analysé l'expression de SUN2 dans des cellules cultivées sur des matrices souples et rigides. Nos résultats montrent une augmentation significative

de l'expression de SUN2 dans les cellules cultivées sur une matrice rigide. Swift *et al.*, ont établi une corrélation positive entre la rigidité de tissus murins et l'expression de SUN2, en accord avec nos résultats et ont montré que la rigidité de la MEC régule l'expression la lamine-A, partenaire de SUN2 (Swift et al., 2013). De plus, la stabilité de la lamine-A augmente avec la rigidité de la MEC. Dans des cellules cultivées sur une matrice souple, la lamine-A est plus phosphorylée et donc plus dégradée que sur une matrice rigide (Buxboim et al., 2014). De la même façon, nous avons mis en évidence que l'augmentation de l'expression de SUN2 sur matrice rigide, est due à une augmentation de sa stabilité.

L'accumulation des protéines de l'enveloppe nucléaire à la membrane nucléaire interne, dépend d'un mécanisme de diffusion-rétention. Les protéines se distribuent librement à l'enveloppe nucléaire, puis leur mobilité est réduite et elles sont retenues à la membrane nucléaire interne. Cette accumulation est notamment favorisée par leur interaction avec d'autres partenaires nucléaires (Ungricht et al., 2015). La stabilité de SUN2 sur matrice rigide pourrait donc être régulée par ce mécanisme. Le pont disulfure liant les domaines SUN et KASH est nécessaire pour stabiliser l'interaction de SUN2 et de la nesprine-2 en réponse aux forces de tension (Jahed et al., 2015). Les régions coiled-coil de SUN2 favorisent également son interaction avec les nesprines. Il a été montré que les régions coiled-coil sont sensibles au stress mécanique (Gao et al., 2011), il est donc possible que celles de SUN2 y soient sensibles également. Il serait intéressant de générer des mutations sur le pont disulfure liant SUN2 et la nesprine-2 et sur les régions coiled-coil de SUN2 (Nie et al., 2016; Sosa et al., 2012) et d'en observer les effets sur la stabilité de SUN2 en fonction de la rigidité de la MEC.

De plus, lorsqu'elles sont cultivées sur des substrats rigides, les cellules forment plus de filaments d'actine périnucléaires (Lovett et al., 2013), connectés aux nesprines. La tension générée par les filaments d'actine pourrait donc stimuler l'association de SUN2 avec les nesprines *via* le pont disulfure et/ou les régions coiled-coil et ainsi stabiliser SUN2. SUN2 serait alors un mécano-senseur. Cette hypothèse pourrait être testée en inhibant la myosine et en observant les conséquences sur la conformation de SUN2 et sur l'association entre le domaine SUN et le domaine KASH à l'aide d'un AFM (del Rio et al., 2009).

Il est également intéressant de noter qu'une accumulation de la protéine SUN1 a été observée dans des cellules de patients atteints de progeria, pathologie caractérisée par un vieillissement accéléré, causant notamment une rigidification artérielle (Baker et al., 1981; Chen et al., 2012). Il serait intéressant de regarder l'expression de SUN2 dans des modèles animaux caractérisés par des changements de rigidité de la MEC, associés à un accroissement de la prolifération cellulaire, tels que des modèles de souris invalidés pour le gène codant pour l'élastine (Li et al., 1998; Wagenseil et al., 2010) ou développant des tumeurs mammaires (Paszek et al., 2005) ; mais également à l'inverse, dans des modèles où la MEC est plus élastique à la suite par exemple d'une déplétion du collagène, favorisant notamment le développement d'anévrismes (Humphrey et al., 2014).

➤ **SUN2 favorise la progression mitotique en régulant la formation du cortex d'actine**

Pour tester l'implication de SUN2 dans la progression mitotique en réponse à la rigidité de la MEC, nous avons transfecté un siRNA ciblant SUN2 dans des cellules cultivées sur des matrices souples et rigides. Nos résultats montrent que la déplétion de SUN2 dans des cellules cultivées sur une matrice rigide induit un allongement de la mitose. De façon intéressante, la durée de la mitose observée est presque similaire avec celle observée pour des cellules cultivées sur une matrice souple. Ces résultats mettent en évidence, pour la première fois à notre connaissance, le rôle important de SUN2 dans la régulation de la progression mitotique en réponse à la rigidité de la MEC.

La rigidité de la MEC semblant avoir un impact sur la métaphase, nous avons quantifié la durée de chaque phase dans des cellules déplétées pour SUN2. Nos résultats montrent que la déplétion de SUN2 est suffisante pour ralentir significativement la mitose et plus particulièrement la métaphase. Les protéines SUN1 et SUN2 favorisent la rupture de l'enveloppe nucléaire lors de la prométaphase et leur co-déplétion ralentit la progression mitotique (Turgay et al., 2014). Or, nos résultats montrent que la déplétion de SUN1 n'a pas d'effet sur la progression mitotique, ce qui met en évidence une nouvelle fonction spécifique de SUN2 au cours de la mitose, plus particulièrement de la métaphase.

L'allongement du fuseau mitotique retarde l'arrivée en anaphase

Ce ralentissement de la métaphase est associé à une augmentation de la longueur du fuseau mitotique. Le passage de la métaphase à l'anaphase dépend du SAC qui nécessite la formation correcte du fuseau mitotique, permettant ainsi l'attachement stable de tous les chromosomes. Pour un type cellulaire donné, la longueur du fuseau mitotique est relativement constante et reste stable au cours de la métaphase (Goshima and Scholey, 2010). Des défauts de la longueur du fuseau sont associés à des retards de la progression mitotique. Par exemple, une déplétion de la moésine induit le raccourcissement du fuseau mitotique et l'allongement de la durée de la métaphase (Kunda et al., 2008). Une déplétion de la myosine-10 allonge le fuseau mitotique et de la même façon induit une augmentation de la durée de la métaphase (Woolner et al., 2008). L'application d'un confinement sur les cellules, induit également un allongement du fuseau mitotique et la formation de fuseaux multipolaires ce qui ralentit l'entrée en anaphase. Ce retard à l'entrée en anaphase est dû notamment à un défaut de capture des chromosomes empêchant le passage du SAC (Lancaster et al., 2013). Des travaux récents proposent un modèle selon lequel la taille du fuseau mitotique, plus particulièrement le ratio entre sa largeur et sa longueur influence le passage du SAC. Selon ce modèle, la satisfaction du SAC requerrait une relation allométrique entre la longueur et la largeur du fuseau. Par exemple, un fuseau mitotique plus long nécessiterait un ratio largeur/longueur faible pour la satisfaction du SAC (Chen and Liu, 2016).

L'augmentation de la taille du fuseau observée en l'absence de SUN2 pourrait donc expliquer le retard dans la transition métaphase-anaphase. Pour préciser un défaut de passage du SAC, il conviendrait de déterminer si tous les chromosomes sont bien attachés aux microtubules du fuseau mitotique, en analysant par exemple la présence de MAD2 au niveau des kinétochores, ou en observant l'effet de l'inhibition de MAD2 sur la durée de la mitose, dans des cellules déplétées pour SUN2 et cultivées sur des matrices de différentes rigidités. Il a également été montré que la co-déplétion de SUN1 et SUN2 induit d'autres défauts morphologiques du fuseau, une augmentation du nombre de fuseaux multipolaires ainsi qu'un défaut d'orientation du fuseau mitotique (Turgay et al., 2014). Il serait intéressant de déterminer si nos cellules présentent de telles anomalies suite à la déplétion de SUN2.

La déplétion de SUN2 induit des défauts du cortex d'actine

La forme de la cellule est un régulateur important de la morphologie et de l'orientation du fuseau mitotique. Il a été observé que pour des « petites cellules » comme les cellules HeLa par exemple, la taille du fuseau suit la taille de la cellule (Good et al., 2013; Jiang, 2015; Li and Jiang, 2017; Novakova et al., 2016; Wühr et al., 2008).

Nos résultats montrent que l'augmentation de la longueur du fuseau mitotique est associée à une augmentation du diamètre cellulaire. À l'entrée en mitose, la cellule s'arrondit, pour assurer l'espace nécessaire pour l'assemblage et le positionnement correct du fuseau mitotique (Carreno et al., 2008; Kaji et al., 2008; Kunda et al., 2008; Luxenburg et al., 2011). Plusieurs travaux ont montré qu'en altérant la morphologie cellulaire par des techniques de confinement, le fuseau mitotique s'allonge, s'élargit et n'est plus orienté parallèlement au substrat (Cattin et al., 2015; Dumont and Mitchison, 2009; Lancaster et al., 2013; Sorce et al., 2015). Comme il a été évoqué précédemment, ces défauts induisent un ralentissement de la progression mitotique et peuvent également avoir pour conséquence une mauvaise répartition du matériel génétique, causant des aneuploïdies, ou conduire à la mort cellulaire. L'altération de la morphologie cellulaire que nous observons pourrait donc être à l'origine de l'allongement du fuseau mitotique.

L'arrondissement cellulaire à l'entrée en mitose requiert la formation du cortex d'actine (Cramer and Mitchison, 1997; Fujibuchi et al., 2005; Kaji et al., 2008; Luxenburg et al., 2011) et sa contraction *via* la myosine (Sorce et al., 2015; Stewart et al., 2011a). Nos résultats montrent que la déplétion de SUN2 induit une diminution de la localisation de l'actine au cortex et une réduction de la tension corticale. Il a été montré que la déstabilisation du cortex d'actine, induit des défauts de formation et de positionnement du fuseau mitotique ainsi qu'un retard global de la mitose souvent dû à un retard à l'entrée en anaphase (Carreno et al., 2008; Kaji et al., 2008; Kunda et al., 2008; Luxenburg et al., 2011; Sorce et al., 2015). L'allongement de la métaphase que nous observons pourrait donc être une conséquence de l'altération de la morphologie cellulaire et de l'allongement du fuseau mitotique, eux-mêmes causés par des défauts du cortex d'actine. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions restaurer

la tension corticale de la même manière que Kunda *et al.*, en utilisant la concanavaline A et en observer l'effet sur la morphologie cellulaire, la longueur du fuseau mitotique et la durée de la mitose.

Lorsque les cellules se divisent en situation de confinement, la formation d'un cortex d'actine est nécessaire à l'établissement du fuseau mitotique (Lancaster *et al.*, 2013). Dans les tissus dont la MEC est rigide, la stabilisation de SUN2 pourrait constituer un mécanisme d'adaptation favorisant le recrutement d'actine au cortex lors de la mitose et permettant ainsi la division cellulaire. Nos résultats montrant que le niveau d'expression de SUN2 affecte la production de forces lors de la prométaphase, il serait donc intéressant d'analyser l'impact de la déplétion de SUN2 sur la progression mitotique et la mise en place du fuseau mitotique lorsque les cellules sont maintenues en situation de confinement, au moyen par exemple de coussins d'agarose de rigidités différentes (Dumont and Mitchison, 2009; Lancaster *et al.*, 2013).

Nous avons ensuite cherché à élucider les mécanismes par lesquels SUN2 favorise le recrutement de l'actine au cortex et la tension corticale.

SUN2 favorise la formation du cortex d'actine en activant FHOD1

Le cortex d'actine est formé dès la prophase : Ect2 est phosphorylé, ce qui favorise son activité de GEF, et libéré dans le cytoplasme où il active RhoA, qui stimule la formine mDia1 pour promouvoir la nucléation de l'actine (Bovellan *et al.*, 2014; Maddox and Burridge, 2003; Matthews *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2015). Nos résultats montrent qu'en l'absence de SUN2, la localisation de l'actine au cortex est réduite, suggérant un défaut de formation du cortex. Cependant l'activité de Ect2 n'est pas modifiée en l'absence de SUN2 dans les cellules en mitose.

Les formines sont impliquées dans la nucléation et l'organisation du cytosquelette d'actine. De manière intéressante, il a été mis en évidence que la formine FHOD1 interagit avec SUN2 en interphase (Antoku *et al.*, 2015; Kutscheidt *et al.*, 2014), et que des défauts du nucléosquelette peuvent influencer l'activité de FHOD1 (Schwartz *et al.*, 2017). Nous nous sommes donc intéressés à la formine FHOD1.

Nous avons montré que FHOD1 est activée en mitose et que SUN2 participe à son activation. De plus, la déplétion de FHOD1 induit une réduction de la tension corticale et une augmentation de la durée de la mitose de la même façon que la déplétion de SUN2. Ces résultats suggèrent que SUN2 pourrait favoriser l'activation de FHOD1, afin de promouvoir le recrutement de l'actine au cortex, la tension corticale et la progression mitotique.

FHOD1 est une protéine de la famille des diaphanous related formins qui contrairement à la majorité des formines ne stimule pas la nucléation et l'élongation des filaments d'actine mais favorise la formation et l'organisation des fibres de stress et empêche la dépolymérisation des filaments d'actine en coiffant leur extrémité barbée (Gasteier et al., 2003; Schönichen et al., 2013; Schulze et al., 2014). Lors de la cytokinèse, FHOD1 coordonne l'assemblage des filaments d'actine à la périphérie cellulaire, permettant de définir la forme et la polarité des cellules filles, favorisant ainsi leur ré-étalement post-mitotique (Floyd et al., 2013). De façon intéressante, il a également été montré que lors de la méiose ovocytaire, FHOD1 régule la localisation de l'actine cytoplasmique, associée au fuseau mitotique et nécessaire à sa migration (Pan et al., 2017). FHOD1 pourrait donc participer à l'assemblage du cortex d'actine lors de l'entrée en mitose.

Nos résultats montrent que SUN2 favorise l'activation de FHOD1 en mitose. FHOD1 est un effecteur de la GTPase RhoA, elle est phosphorylée par ROCK ce qui lève son auto-inhibition et l'active (Hannemann et al., 2008; Takeya et al., 2008). Cependant, la déplétion de SUN2 dans les cellules en mitose, n'induit pas de modification de l'activité de ROCK. Ces résultats montrant que l'activation de la voie Ect2/RhoA n'est pas affectée par l'absence de SUN2, ils suggèrent l'implication d'une autre voie d'activation de FHOD1. La localisation subcellulaire des formines constituant une part importante de leur régulation (Baarlink and Grosse, 2014; Kühn and Geyer, 2014), SUN2 pourrait permettre le recrutement de FHOD1 auprès de ROCK pour favoriser son activation. FHOD1 est également phosphorylée par d'autres kinases, la cGMP-dependent protein kinase I (Wang et al., 2004) et Aurora B lors de la cytokinèse (Floyd et al., 2013). Cependant, les sites de phosphorylation connus pour ces kinases, sont différents de celui que nous avons analysé. Les mécanismes par lesquels SUN2 favorise l'activation de FHOD1 restent donc à déterminer.

Au niveau physiopathologique, FHOD1 est impliquée dans le cancer, son expression est augmentée dans les mélanomes (Gardberg et al., 2013; Peippo et al., 2017). Nos résultats montrent que FHOD1 est activée lors de la mitose, elle pourrait donc constituer une cible pharmacologique pour bloquer la division cellulaire anarchique.

➤ **SUN2 peut-elle réguler la progression mitotique par d'autres mécanismes ?**

Nos résultats suggèrent que SUN2 affecte la progression mitotique en régulant la formation du cortex d'actine *via* l'activation de FHOD1. Cependant, SUN2 pourrait être impliquée dans d'autres mécanismes ayant des conséquences sur la progression mitotique.

SUN2 comme régulatrice directe de la longueur du fuseau mitotique

La longueur du fuseau mitotique est régulée par de nombreux facteurs (Goshima and Scholey, 2010) : la polymérisation ou dépolymérisation des microtubules (Gaetz and Kapoor, 2004; Varga et al., 2009), le glissement des microtubules interpolaire (Brust-Mascher et al., 2009; Cai et al., 2009; Su et al., 2013), les chromosomes (Dinarina et al., 2009; Nicklas et al., 1995), la connexion avec le cortex d'actine *via* la dynéine (Guild et al., 2017) ou la géométrie cellulaire (Lancaster et al., 2013). Turgay et al. suggèrent que le complexe LINC, conservé en prophase, pourrait former un complexe avec la dynéine pour générer des forces au niveau des microtubules astraux, favorisant la rupture de l'enveloppe nucléaire (Turgay et al., 2014).

Le complexe LINC pourrait de la même façon former une interface entre le cortex d'actine et les microtubules *via* la dynéine pour réguler la longueur du fuseau mitotique en métaphase. Il a été montré que la lamine A/C, la protéine LAP2 α , une protéine de la membrane nucléaire interne et la protéine Barrier-to-autointegration factor 1, forment un complexe de ce type au niveau du cortex pour réguler la morphologie et le positionnement du fuseau mitotique (Qi et al., 2015). De plus ces protéines sont également localisées au fuseau mitotique et participeraient à l'assemblage de la matrice du fuseau.

La matrice du fuseau mitotique, dont l'existence est sujette à de nombreux débats, serait une structure membranaire et protéique ne contenant pas de microtubules, entourant le fuseau mitotique et ayant un rôle de support pour son assemblage et pour les protéines motrices générant des forces au sein du fuseau (Johansen and Johansen, 2007; Scholey et al., 2001; Zheng, 2010). Samp1, protéine de l'enveloppe nucléaire interne et partenaire de SUN2 en interphase (Borrego-Pinto et al., 2012) et de SUN1 en mitose (Patel et al., 2014), a été décrite comme un potentiel composant de la matrice du fuseau mitotique. Elle est localisée au niveau des régions polaires du fuseau mitotique en métaphase et colocalise avec des membranes intracellulaires associées au fuseau (Buch et al., 2009; Figueroa et al., 2010). Ces résultats sont plutôt surprenants, car il est communément admis que lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, les protéines de l'enveloppe sont dispersées dans le réticulum endoplasmique (Güttinger et al., 2009). Cependant, la lamine-B, associée à l'enveloppe nucléaire en interphase, a également été décrite comme étant un composant de la matrice du fuseau mitotique (Tsai et al., 2006). On ne peut donc pas exclure que certaines protéines de l'enveloppe, comme SUN2, pourraient participer à la composition de la matrice du fuseau. Il conviendrait dans un premier temps de suivre la localisation de SUN2 au cours de la mitose, pour déterminer sa contribution dans cette structure. De plus, il a été suggéré que la matrice du fuseau mitotique générerait des forces de tension entre les pôles du fuseau et s'opposerait à l'élongation des microtubules pour réguler la longueur du fuseau mitotique (Mitchison et al., 2005; Pickett-Heaps et al., 1997). Un défaut de cette matrice, pourrait donc participer à l'allongement du fuseau mitotique observé dans les cellules déplétées pour SUN2.

Implication dans l'expression génique

Il est admis que la transcription est un processus sensible à la rigidité de la MEC. L'exemple le mieux décrit est celui du complexe YAP/TAZ qui, lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice rigide, est transloqué dans le noyau pour activer des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation (Dupont et al., 2011). De plus, il a récemment été montré que le complexe LINC est impliqué dans la transmission de forces induisant l'étirement de la chromatine ce qui active la transcription (Tajik et al., 2016) et que SUN1 joue un rôle dans la transcription de gènes en réponse aux changements de rigidité de la MEC (Alam et al., 2016).

SUN2 pourrait donc agir sur l'expression de gènes impliqués dans la progression mitotique et ce de plusieurs façons :

- En tant que composant du complexe LINC, SUN2 pourrait transmettre les changements de rigidité de la MEC à ses partenaires comme les lamines ou l'émerine, qui interagissent avec la chromatine et pourraient ainsi induire son remodelage en réponse à la rigidité (Barton et al., 2015; Berk et al., 2013; Dechat et al., 2008; Haque et al., 2010). Ce remodelage de la chromatine pourrait alors activer ou réprimer la transcription de gènes impliqués dans la progression mitotique. Il a été montré chez la plante *Arabidopsis thaliana* que les protéines SUN influencent l'organisation de la chromatine. Des mutants des protéines SUN induisent la décompaction de l'ADN et la dé-répression de la transcription au niveau de l'hétérochromatine (Poulet et al., 2017). Dans des cellules humaines en culture, SUN1 participe à la décondensation des chromosomes et favorise l'acétylation des histones H2B et H4 lors de la reformation de l'enveloppe nucléaire à la fin de la mitose (Chi et al., 2007). Ces résultats sont particulièrement intéressants sachant que l'acétylation des histones favorise la décompaction de la chromatine pour permettre aux facteurs de transcription d'accéder à l'ADN pour activer des gènes cibles (Anderson et al., 2001; Lee et al., 1993; Sewack et al., 2001).
- SUN2 pourrait également favoriser le recrutement de facteurs de transcription répondant aux forces tels que le complexe YAP/TAZ ou le Megakaryoblastic leukemia factor-1, cofacteur du Serum response factor, impliqué notamment dans la régulation de la prolifération des CMLs (Huang et al., 2012; Mendez and Janmey, 2012; Werth et al., 2010). La lamine-A par exemple, dont l'expression et la conformation sont sensibles à la rigidité de la MEC, régule la translocation du récepteur à l'acide rétinoïque dans le noyau qui agit comme facteur de transcription pour contrôler en retour la transcription de la lamine-A (Swift et al., 2013).
- SUN2 pourrait enfin directement interagir avec l'ADN et agir lui-même comme cofacteur ou facteur de transcription en réponse aux forces. Même si une localisation spécifique de SUN2 au niveau des télomères lors de la méiose a été mise en évidence (Schmitt et al., 2007) une interaction directe avec l'ADN reste à démontrer, en utilisant par exemple des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine. Chez le

protozoaire *Dictyostelium discoideum*, SUN1 possède un domaine de liaison à la chromatine au niveau de son extrémité N-terminale qui permet notamment sa localisation à la membrane nucléaire interne de l'enveloppe nucléaire (Xiong et al., 2008).

Une puce a été réalisée au laboratoire, afin de comparer l'expression de gènes dans des cellules déplétées pour SUN2 et cultivées sur des matrices souples et rigides, ce qui nous permettra de mieux comprendre l'effet de SUN2 sur l'expression de gènes.

CONCLUSION

Les propriétés mécaniques de la MEC influencent de nombreux aspects du comportement cellulaire. Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les effets de l'environnement mécanique sur la progression mitotique en montrant que la durée de la mitose est sensible à la rigidité de la MEC et que cette sensibilité à la rigidité est notamment régulée par la protéine SUN2.

Nos résultats suggèrent le modèle suivant : l'augmentation de l'expression de SUN2 et de sa stabilité dans des cellules cultivées sur une matrice rigide en interphase, favoriserait l'activation de la formine FHOD1 en mitose. L'activation de FHOD1 promouvrait alors le recrutement de l'actine au niveau cortical et la tension corticale. La mise en place du cortex d'actine par FHOD1 régulerait la morphologie du fuseau mitotique et favoriserait donc la progression de la métaphase ([Figure 44](#)).

Nos travaux mettent donc en évidence une nouvelle adaptation du comportement cellulaire au microenvironnement mécanique.

Il serait intéressant d'évaluer si cette réponse est réversible et dans quelle mesure. Les lignées cellulaires que nous avons utilisées sont en effet continuellement cultivées sur du plastique, un matériau rigide et elles semblent s'adapter rapidement aux modifications de rigidité, en se divisant plus lentement lorsque nous les ensemençons sur une matrice souple. Il serait intéressant de voir si des cultures primaires issues d'un tissu ayant une MEC souple et cultivées d'abord sur des matrices souples, se mettent à se diviser plus rapidement lorsqu'elles sont transférées sur une matrice rigide.

La notion de « mémoire » de la rigidité est particulièrement intéressante. Il a été montré que de tels mécanismes de mémoire existent dans des fibroblastes issus de poumons qui, s'ils sont cultivés trois semaines sur un substrat rigide se différencient en myofibroblastes et gardent ce phénotype myofibroblastique même après avoir été transférés sur des substrats souples. À l'inverse, cultiver au préalable les fibroblastes sur des substrats souples les « protège » d'un passage à un phénotype

myofibroblastique lors de leur transfert sur des substrats rigides (Balestrini et al., 2012). Des travaux plus récents ont mis en évidence l'existence d'une mémoire de la rigidité dans les cellules épithéliales et les cellules souches mésenchymateuses (Nasrollahi et al., 2017; Yang et al., 2014). L'exposition des CSM à un substrat rigide permet l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation ostéogénique tels que YAP/TAZ. Or, lorsque les CSM sont transférées sur un substrat souple, l'activité de ces facteurs persiste et cette persistance dépend du temps de culture préalable sur un substrat rigide, suggérant l'existence d'une mémoire mécanique (Eyckmans and Chen, 2014; Yang et al., 2014). Le support moléculaire de cette mémoire n'a pas encore été identifié mais la chromatine et les modifications épigénétiques portées par les histones semblent être de bonnes candidates (Heo et al., 2015). Les protéines nucléaires sont particulièrement stables (Toyama et al., 2013) et pourraient également constituer une empreinte moléculaire persistante dans le temps, de la même façon que le cortex cellulaire garde l'empreinte des adhérences lors de la mitose. Le remodelage du nucléosquelette, induit par la stabilisation de SUN2 ou de la lamine-A pourrait donc servir de support moléculaire à cette mémoire mécanique.

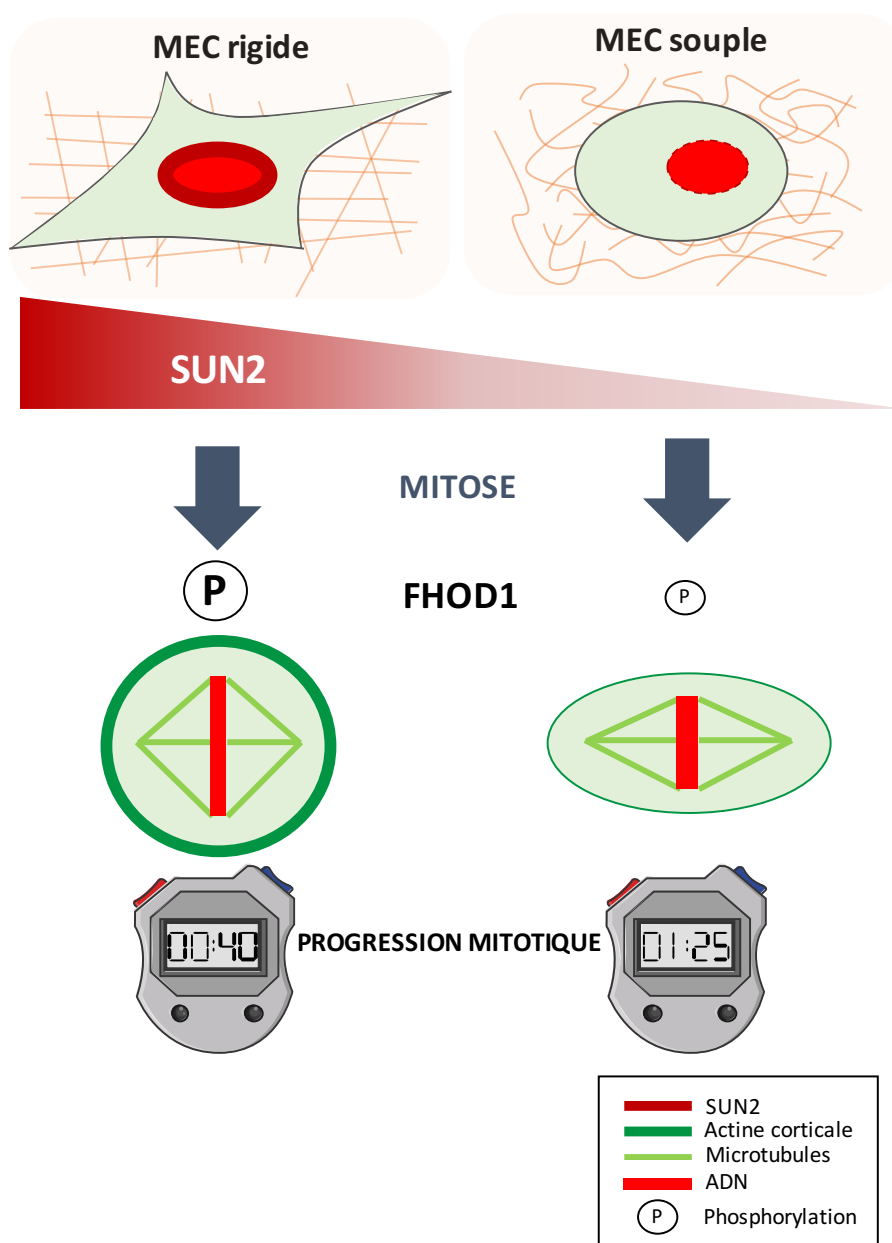


FIGURE 44 : SUN2 RÉGULE LA DURÉE DE LA MITOSE EN RÉPONSE À LA RIGIDITÉ DE LA MEC

Selon le modèle suggéré par nos travaux, l'augmentation des niveaux de SUN2 sur matrice rigide favoriserait la progression mitotique en activant FHOD1 *via* une augmentation de sa phosphorylation. FHOD1 participerait au recrutement de l'actine au niveau cortical et à la génération de forces au niveau du cortex. Cela régulerait les dimensions du fuseau mitotique et la forme de la cellule, favorisant ainsi l'avancement de la métaphase et donc la progression mitotique.

ANNEXES

ARTICLE n°2

Analyzing mechanotransduction through the LINC complex in isolated nuclei

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

(Article en révision dans Methods in Molecular Biology, 2017)

Résumé : Les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire peuvent avoir une incidence sur de nombreux aspects du comportement cellulaire, y compris les processus moléculaires au sein du noyau. De récentes études indiquent que le complexe LINC associé à l'enveloppe nucléaire permet de transmettre et transformer le stress mécanique en voies biochimiques, capables de réguler la structure nucléaire ou l'expression des gènes. Nous décrivons ici une méthode pour appliquer des forces de tension au complexe LINC sur des noyaux cellulaires isolés. En utilisant des billes magnétiques et des aimants, cette technique permet d'explorer les voies biochimiques qui sont activées en réponse à la tension appliquée à la surface des noyaux isolés.

Analyzing Mechanotransduction Through the LINC Complex in Isolated Nuclei

AUTHORS

Belaadi Nejma¹, Millon-Frémillon Angelique², Aureille Julien² and Guilluy Christophe²

¹l'institut du thorax, Inserm, CNRS, université de Nantes, 44000 Nantes, France.

² Institute for Advanced Biosciences, Centre de recherche UGA - INSERM U1209 - CNRS UMR, Grenoble, France

CORRESPONDING AUTHOR

Correspondence to: Christophe Guilluy at christophe.guilluy@inserm.fr

KEYWORDS

Mechanotransduction, lamina, nucleus, mechanical tension, nesprin

Abstract

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

1 Introduction

Almost three centuries after the pioneering observations of the nucleus using light microscopy [1], electron microscopy images revealed that the nucleus is not isolated within the cell, but is connected to cytoskeletal filaments instead [2,3]. The proteins that connect the cytoskeleton to the nuclear envelope constitute the Linker of the Nucleoskeleton and

Cytoskeleton (LINC) complex [4,5]. This complex is composed of SUN (Sad1 and UNC-84) proteins anchored in the inner nuclear membrane and nesprin (nuclear envelope spectrin-repeat-containing proteins) anchored in the outer nuclear membrane [4,6]. SUN proteins interact with nesprins within the perinuclear space through their highly conserved SUN (Sad1 Unc-84 homology) domain and KASH (Klarsicht, ANC-1, and Syne homology) domain respectively [4].

The LINC complex constitutes a network of transmembrane proteins that transmit force between the cytoskeleton and the nuclear envelope [7,8]. Using various techniques to apply mechanical stress to nuclei, recent work showed that mechanotransduction mechanisms exist in the nucleus and transduce mechanical stress into signaling pathways that ultimately regulate nuclear structure or gene expression [9–12]. Interestingly, these recent advances revealed the LINC complex behaves like cell surface adhesion and undergoes remodeling in response to mechanical tension [8]. Here we describe a method that we designed to apply tensional forces to isolated nuclei using magnetic beads and magnets. This method is adapted from techniques that have been used to analyze the cellular response to forces applied to cell surface adhesion receptors [13–16].

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

2 Materials

The superparamagnetic beads used in this method are the 2.8 μm diameter tosyl-activated magnetic beads from Invitrogen (Dynabeads M-280 Tosyl-activated; Cat. #142.03). The magnets used to stimulate isolated nuclei with 30–40 pN force are the 1.25-inch-diameter $\times$ 0.25-inch-

thick nickel-plated neodymium (grade N52) magnet (K&J Magnetics). All solutions were prepared using ultrapure water and common chemicals were from Sigma Aldrich and Fisher Scientific. A Dounce homogenizer (7 ml capacity; Bellco, cat. no. 1984-10007) is used to isolate the nuclei. The buffers used to isolate and stimulate the nuclei are detailed below.

2.1 Buffers

- 1 Hypotonic buffer. Combine 10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol, and protease inhibitors (freshly added before use).
- 2 Buffer A. Combine 0.1M Sodium Phosphate Buffer, pH 7.4.
- 3 Buffer B. Combine 0.01 M Sodium Phosphate, 0.0137 M NaCl, and 0.5% (w/v) delipidated BSA, pH 7.4.
- 4 Buffer C. Combine 20 mM HEPES pH 7.8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.25 M sucrose and 1 mM ATP (freshly added before use).
- 5 Buffer D. Combine 20 mM HEPES at pH 7.8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 1 mM ATP (freshly added before use).

2.2 Magnetic bead conjugation

- 1 Wash 90 µL of 2.8 µm tosyl-activated Dynal beads in 1mL of Buffer A in 1.5mL microcentrifuge tube and use the Dynamag magnet separator to collect the beads and aspirate the medium.
- 2 Mix 20 µg of anti nesprin-2 antibody (Abcam) with appropriate volume of Buffer B to bring the total volume to 200 µL and mix by pipetting (Other antibodies targeting different isoforms of nesprin can be used here).
- 3 Combine antibody with beads and incubate for 24 hours at 37 °C on a rotor to allow covalent linkage of antibody to the bead.
- 4 Collect the beads using the magnetic separator (Dynamag).
- 5 Wash beads 3 times with 1mL PBS using the magnetic separator to collect the beads.

6 Resuspend the beads in 1 mL PBS to give a concentration of 6×10^8 beads/mL. Store beads at 4°C for up to 1 month.

3 Method

3.1 Nucleus isolation

- 1 Use near-confluent Hela cells plated on 150 mm dishes and serum starved for 16 h.
- 2 Aspirate the medium and wash two times with 10 ml PBS at 37 °C.
- 3 Aspirate the PBS.
- 4 Add ice-cold hypotonic buffer (6 ml) and detach the cell bodies using a cell scraper
- 5 Homogenize the samples using 30 strokes of a Dounce homogenizer.
- 6 Transfer the sample to a 15-ml conical tube on ice. Incubate for 5 min on ice.
- 7 Transfer the sample to a 15-ml conical tube on ice. Incubate for 5 min on ice.
- 8 Centrifuge at 700g for 5 min at 4 °C.
- 9 Resuspend the pellet in hyponic buffer and centrifuge at 700g for 5 min at 4 °C.
- 10 Resuspend the nuclear pellet in buffer C (10 ml).

Following their isolation, the nuclei can be plated and stimulated in order to perform biochemical assay (as described below in 3.2) or force experiments using magnetic tweezers. For mechanical force experiments, the format of the slide or coverslip and volume of buffer depend on the magnetic tweezers set-up. Typically 10,000 nuclei are plated on a 12 mm diameter coverslip for 30 min at 37 °C in 0.5 ml of buffer C. The nuclei are then incubated with magnetic beads at 37 °C for 20 min. After two washes with buffer C, the appropriate volume of buffer D is added for 15 min at 37 °C. Magnetic tweezers can be used to apply pN tensional force to magnetic beads bound to nesprins. When coupled to live cell imaging, this experimental system allows the measurement of local viscoelastic properties by tracking the bead displacement due to

a known force generated by the magnetic field from an electromagnetic pole tip. Figure 1a shows a representative bead displacement in response to constant force pulses of 50 pN.

3.2 Application of tension to cells to LINC complex using magnetic beads and permanent magnets for biochemical analysis

- 1 Plate 10^6 nuclei on poly-L-lysine-coated dishes (35 mm) for 30 min at 37 °C in 1 ml of buffer C.
- 2 Incubate nuclei with magnetic beads ($2 \cdot 10^6$ beads per dish) conjugated with anti-nesprin-2 at 37 °C for 20 min.
- 3 Wash twice with buffer C, and add 1 ml of buffer D for 15 min at 37 °C.
- 4 Stimulate with force by suspending the permanent magnet at 4.5 mm over nuclei (permanent magnet can be placed on the lid of the dish) for the appropriate amount of time.
- 5 Aspirate Buffer D.
- 6 Add 300 μ L of lysis buffer (20 mM Tris at pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM $MgCl_2$, and protease inhibitors) and use the cell scraper to detach the nuclei.
- 7 Collect the lysate in a 1.5 ml microcentrifuge tube and incubate on ice for 5 min.
- 8 Homogenize by pipetting and collect 50 μ L for total nuclear fraction.
- 9 Collect the beads using the magnetic separator.
10. Wash three times using lysis buffer.
11. Collect the beads using the magnetic separator and add 2X Laemli buffer (50 μ L) to constitute the bead fraction.

Total nuclear fraction and bead fraction can then be analyzed using western blot (Figure 1b) or mass spectrometry.

4 Notes

- 1 The method described here uses a magnet for which the resulting force on a 2.8 μm bead is about 30-40 pN (calculated by measuring the displacement of magnetic beads in undiluted glycerol, a Newtonian liquid with known viscosity), however it is possible to use larger magnets to apply larger amount of force.
- 2 The magnets are extremely powerful and should be manipulated carefully.
- 3 Beads can aggregate after conjugation. If vortexing is not sufficient to homogenize, beads separation can be achieved either by pipetting or by using sonication for a short period (20s).
- 4 Depending on cell type, the nuclear fraction (in 3.1) can be contaminated by cytoskeletal elements. If this is the case the steps 5, 6 and 7 can be repeated.
- 5 The volume of laemli buffer added to the beads is only indicative and will depend on the cell type.
- 6 While exploring the tension-dependent signaling pathways, if no changes in the expected mechanosensing processes are detected, different possibilities can be considered. The duration of the stimulation with the magnet may not be sufficient and can be modulated (typical stimulation range from 1 to 10 min). The amount of force may not be sufficient and can be increased by using a thicker magnet (grade N52) or larger beads. To ensure that the LINC complex purification was efficient, western blot can be used to probe for SUN proteins and/or nuclear envelope components. Additionally, analyzing lamin A/C recruitment to the LINC complex in response to force (using western blot in 3.2) can be useful to determine if the force stimulation was sufficient.

Conclusion

Recent work shows that the nucleus may act as a mechanosensitive organelle, whose nucleoskeleton can dynamically remodel in response to mechanical stress. This dynamic reorganization hinges on nuclear mechanotransduction mechanisms, which are only beginning to be elucidated[8]. Various methods have been developed to manipulate and measure mechanical tension at the molecular level, such as atomic force microscopy and molecular “tension sensors” [17]. Here we describe a method using magnetic beads and magnets to stimulate isolated nuclei with pN tensional forces and explore the force-dependent nuclear biochemical pathways.

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

Acknowledgements

We thank Keith Burridge for his continuous support. C.G. is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV1-0008) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant n°639300).

Figure Legends

Figure 1 – Isolated nuclei respond to force applied to the LINC complex.

Figure 1 a - Typical displacement of a 2.8 μm bead coated with anti nesprin-2 antibody bound to an isolated nucleus during force pulse application. Stiffening is indicated by decreased displacement during later pulses.

Figure 1b - Nuclei isolated from Hela cells were incubated with anti nesprin-2 coated magnetic beads. After stimulation with a permanent magnet for 3 min, the nuclei were lysed and the protein complexes associated with the beads (bead complex) were isolated from the lysate using a magnetic separation stand and both fractions were denatured, reduced in Laemmli buffer and analyzed by western blotting.

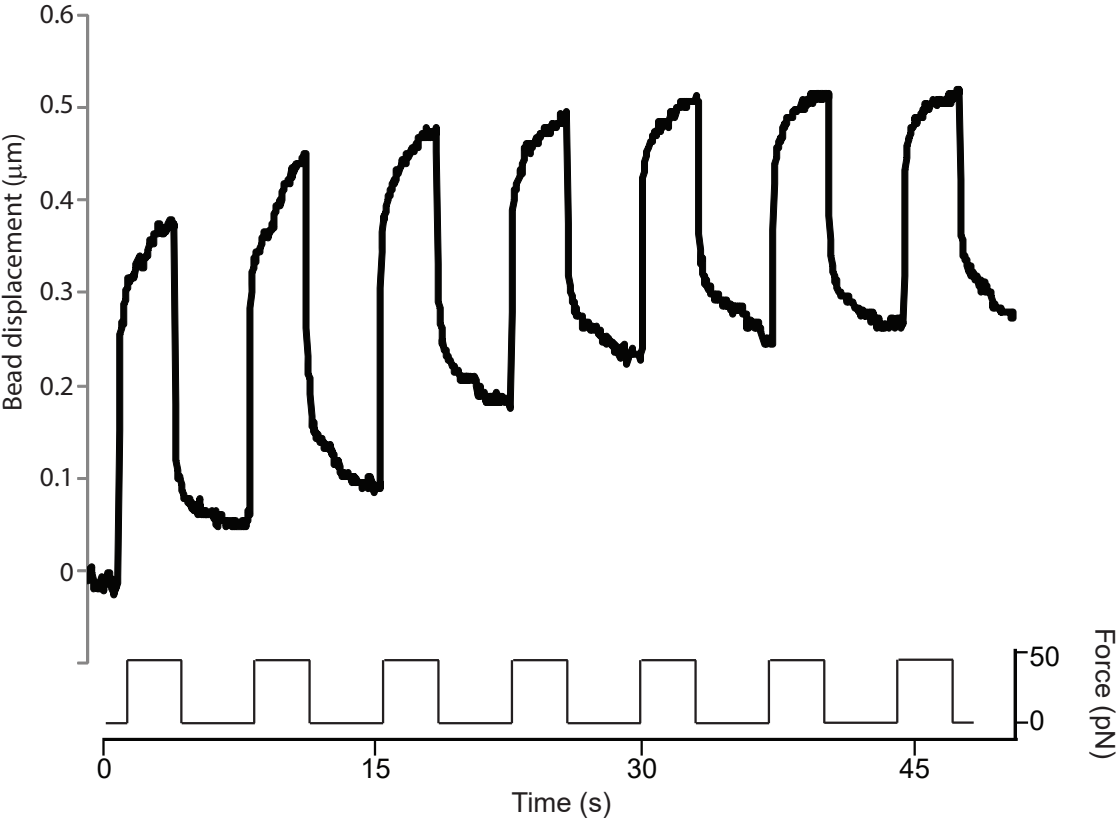
References

1. Pederson, T. The Nucleus Introduced. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 3, a000521, doi:10.1101/cshperspect.a000521.
2. Capco, D. G.; Wan, K. M.; Penman, S. The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell* **1982**, 29, 847–858.
3. Lehto, V. P.; Virtanen, I.; Kurki, P. Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts. *Nature* **1978**, 272, 175–177.
4. Crisp, M.; Liu, Q.; Roux, K.; Rattner, J. B.; Shanahan, C.; Burke, B.; Stahl, P. D.; Hodzic, D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* **2006**, 172, 41–53, doi:10.1083/jcb.200509124.
5. Chang, W.; Worman, H. J.; Gundersen, G. G. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J. Cell Biol.* **2015**, 208, 11–22, doi:10.1083/jcb.201409047.
6. Gundersen, G. G.; Worman, H. J. Nuclear positioning. *Cell* **2013**, 152, 1376–1389, doi:10.1016/j.cell.2013.02.031.
7. Maniotis, A. J.; Chen, C. S.; Ingber, D. E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 849–854.
8. Aureille, J.; Belaadi, N.; Guilluy, C. Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, 44, 59–67, doi:10.1016/j.ceb.2016.10.003.
9. Guilluy, C.; Osborne, L. D.; Van Landeghem, L.; Sharek, L.; Superfine, R.; Garcia-Mata, R.; Burrige, K. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* **2014**, 16, 376–381, doi:10.1038/ncb2927.
10. Swift, J.; Ivanovska, I. L.; Buxboim, A.; Harada, T.; Dingal, P. C. D. P.; Pinter, J.; Pajerowski, J. D.; Spinler, K. R.; Shin, J.-W.; Tewari, M.; Rehfeldt, F.; Speicher, D. W.; Discher, D. E. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **2013**, 341, 1240104, doi:10.1126/science.1240104.
11. Enyedi, B.; Jelcic, M.; Niethammer, P. The Cell Nucleus Serves as a Mechanotransducer of Tissue Damage-Induced Inflammation. *Cell* **2016**, 165, 1160–1170, doi:10.1016/j.cell.2016.04.016.
12. Kumar, A.; Mazzanti, M.; Mistrik, M.; Kosar, M.; Beznoussenko, G. V.; Mironov, A. A.; Garrè, M.; Parazzoli, D.; Shivashankar, G. V.; Scita, G.; Bartek, J.; Foiani, M. ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress. *Cell* **2014**, 158, 633–646, doi:10.1016/j.cell.2014.05.046.

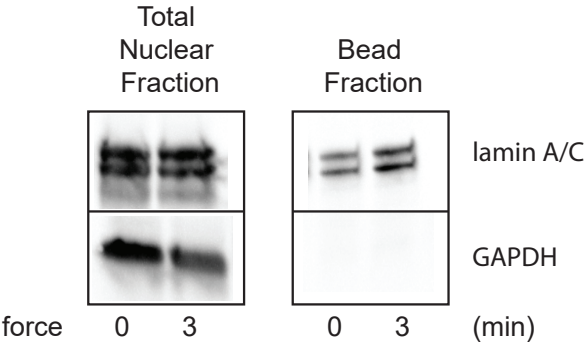
13. Marjoram, R. J.; Guilluy, C.; Burrridge, K. Using magnets and magnetic beads to dissect signaling pathways activated by mechanical tension applied to cells. *Methods San Diego Calif* **2015**, doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.025.
14. Zhao, X.-H.; Laschinger, C.; Arora, P.; Szász, K.; Kapus, A.; McCulloch, C. A. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 1801–1809, doi:10.1242/jcs.001586.
15. Guilluy, C.; Swaminathan, V.; Garcia-Mata, R.; O'Brien, E. T.; Superfine, R.; Burrridge, K. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 722–727, doi:10.1038/ncb2254.
16. Millon-Frémillon, A.; Aureille, J.; Guilluy, C. Analyzing Cell Surface Adhesion Remodeling in Response to Mechanical Tension Using Magnetic Beads. *J. Vis. Exp. JoVE* **2017**, doi:10.3791/55330.
17. Arsenovic, P. T.; Ramachandran, I.; Bathula, K.; Zhu, R.; Narang, J. D.; Noll, N. A.; Lemmon, C. A.; Gundersen, G. G.; Conway, D. E. Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys. J.* **2016**, *110*, 34–43, doi:10.1016/j.bpj.2015.11.014.

Figure 1

a



b



REVUE n°1

Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus.

Belaadi Nejma, Aureille Julien, Guilluy Christophe

(Revue publiée dans Cells, 2016)

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



Review

Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus

Néjma Belaadi ¹, Julien Aureille ² and Christophe Guilluy ^{2,*}

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

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

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

Academic Editor: Thomas Dechat

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

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

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

1. Introduction

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

2. Sensing and Responding to Mechanical Force

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

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

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

3. Mechanical Stress Transmission to the Nucleus

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

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

Nesprin-1 and -2 bind to F-actin [48,60] and to microtubules motors such as kinesin, dynein and meckelin in the cytoplasm [61,62]. Nesprin-3 interacts with plectin, which binds intermediate filaments and integrin $\alpha 6\beta 4$ in keratinocytes [63–66]. Nesprin 4 can connect with microtubules via kinesin [67]. Interestingly, not all nesprins are found anchored in the ONM and some isoforms such as nesprin-1 α or nesprin-2 are located in the INM where they have been shown to interact directly with lamins and emerin [68,69].

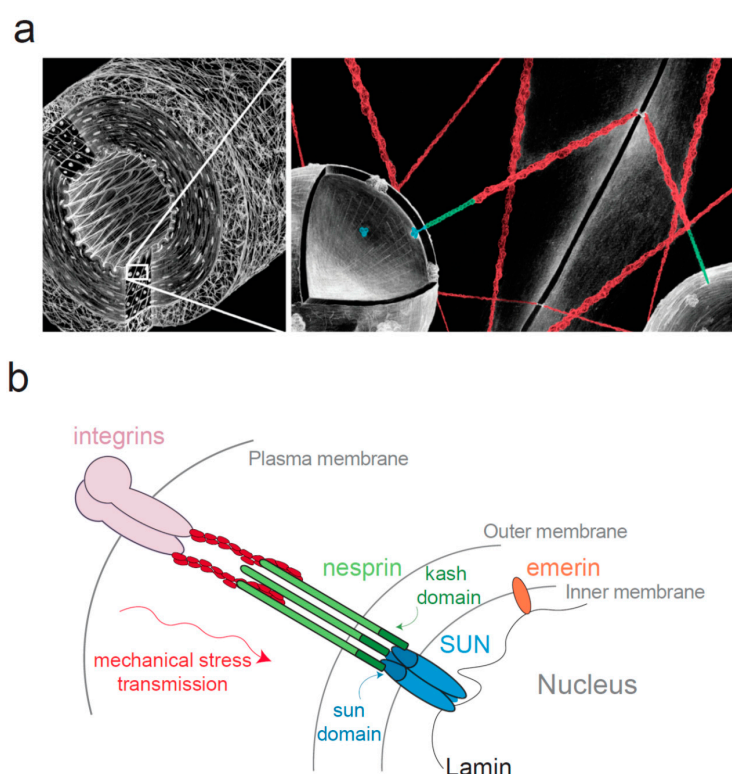


Figure 1. The Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex connects the nucleus to the cytoskeleton. (a) Diagram of a blood vessel (left panel) at two different scales, demonstrating the mechanical continuum that exists between the cell surface adhesion and the nucleus; (b) Schematic representation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

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

4. Mechanical Stress Experienced by the Nucleus

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

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

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

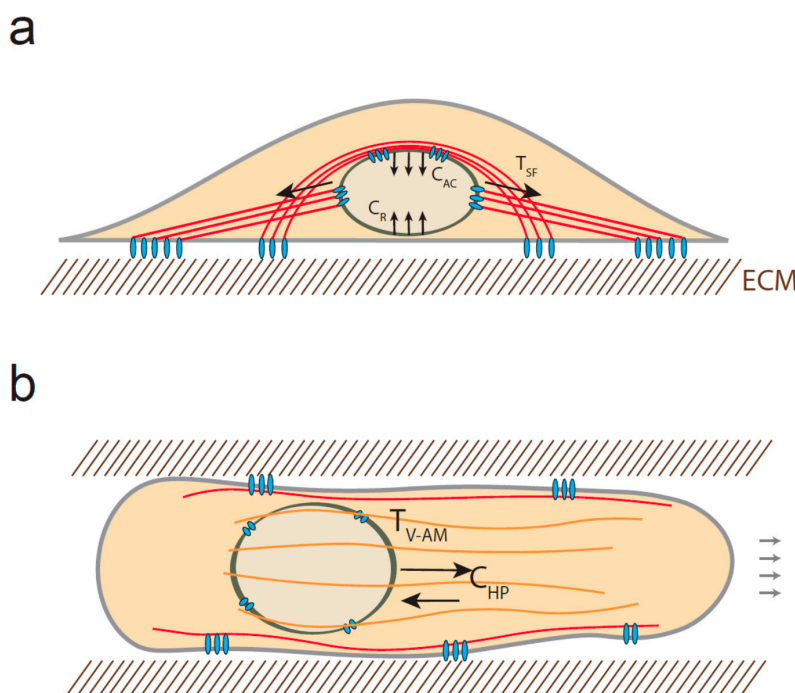


Figure 2. Mechanical stress experienced by the nucleus. (a) Diagram of a stationary cell. When cells are cultured on 2D surfaces, the nucleus can be subjected to tensional forces emanating from stress fibers (T_{SF}) and compressive forces due to the actin cap (C_{AC}) structures and the resistance of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

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

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

5. Nuclear Response to Mechanical Force

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

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

6. Conclusions

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

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

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

References

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

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

37. Swift, J.; Ivanovska, I.L.; Buxboim, A.; Harada, T.; Dingal, P.D.; Pinter, J.; Pajeroski, J.D.; Spinler, K.R.; Shin, J.-W.; Tewari, M.; *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **2013**, *341*, 1240104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Maniotis, A.J.; Chen, C.S.; Ingber, D.E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 849–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Burridge, K.; Molony, L.; Kelly, T. Adhesion plaques: Sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* **1987**, *8*, 211–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kanchanawong, P.; Shtengel, G.; Pasapera, A.M.; Ramko, E.B.; Davidson, M.W.; Hess, H.F.; Waterman, C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **2010**, *468*, 580–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mangeat, P.; Burridge, K. Actin-membrane interaction in fibroblasts: What proteins are involved in this association? *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 95s–103s. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zaidel-Bar, R.; Itzkovitz, S.; Ma'ayan, A.; Iyengar, R.; Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 858–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Crisp, M.; Liu, Q.; Roux, K.; Rattner, J.B.; Shanahan, C.; Burke, B.; Stahl, P.D.; Hodzic, D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* **2006**, *172*, 41–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Padmakumar, V.C.; Libotte, T.; Lu, W.; Zaim, H.; Abraham, S.; Noegel, A.A.; Gotzmann, J.; Foisner, R.; Karakesisoglou, I. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3419–3430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Razafsky, D.; Hodzic, D. Bringing KASH under the SUN: The many faces of nucleo-cytoskeletal connections. *J. Cell Biol.* **2009**, *186*, 461–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Haque, F.; Lloyd, D.J.; Smallwood, D.T.; Dent, C.L.; Shanahan, C.M.; Fry, A.M.; Trembath, R.C.; Shackleton, S. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 3738–3751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chang, W.; Worman, H.J.; Gundersen, G.G. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J. Cell Biol.* **2015**, *208*, 11–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zhen, Y.-Y.; Libotte, T.; Munck, M.; Noegel, A.A.; Korenbaum, E. NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3207–3222. [[PubMed](#)]
49. Hodzic, D.M.; Yeater, D.B.; Bengtsson, L.; Otto, H.; Stahl, P.D. Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25805–25812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhou, Z.; Du, X.; Cai, Z.; Song, X.; Zhang, H.; Mizuno, T.; Suzuki, E.; Yee, M.R.; Berezov, A.; Murali, R.; *et al.* Structure of Sad1-UNC84 homology (SUN) domain defines features of molecular bridge in nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5317–5326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Sosa, B.A.; Rothballer, A.; Kutay, U.; Schwartz, T.U. LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* **2012**, *149*, 1035–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Jahed, Z.; Shams, H.; Mofrad, M.R. A Disulfide Bond Is Required for the Transmission of Forces through SUN-KASH Complexes. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 501–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Göb, E.; Schmitt, J.; Benavente, R.; Alsheimer, M. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One* **2010**, *5*, e12072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Jiang, X.-Z.; Yang, M.-G.; Huang, L.-H.; Li, C.-Q.; Xing, X.-W. SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol.* **2011**, *30*, 875–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pasch, E.; Link, J.; Beck, C.; Scheuerle, S.; Alsheimer, M. The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility. *Biol. Open* **2015**, *4*, 1792–1802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yeh, C.-H.; Kuo, P.-L.; Wang, Y.-Y.; Wu, Y.-Y.; Chen, M.-F.; Lin, D.-Y.; Lai, T.-H.; Chiang, H.-S.; Lin, Y.-H. SEPT12/SPAG4/LAMINB1 complexes are required for maintaining the integrity of the nuclear envelope in postmeiotic male germ cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Schmitt, J.; Benavente, R.; Hodzic, D.; Höög, C.; Stewart, C.L.; Alsheimer, M. Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7426–7431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Turgay, Y.; Champion, L.; Balazs, C.; Held, M.; Toso, A.; Gerlich, D.W.; Meraldi, P.; Kutay, U. SUN proteins facilitate the removal of membranes from chromatin during nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 1099–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Zhang, Q.; Skepper, J.N.; Yang, F.; Davies, J.D.; Hegyi, L.; Roberts, R.G.; Weissberg, P.L.; Ellis, J.A.; Shanahan, C.M. Nesprins: A novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 4485–4498. [[PubMed](#)]
60. Padmakumar, V.C.; Abraham, S.; Braune, S.; Noegel, A.A.; Tunggal, B.; Karakesisoglou, I.; Korenbaum, E. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **2004**, *295*, 330–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Dawe, H.R.; Adams, M.; Wheway, G.; Szymanska, K.; Logan, C.V.; Noegel, A.A.; Gull, K.; Johnson, C.A. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2716–2726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yu, J.; Lei, K.; Zhou, M.; Craft, C.M.; Xu, G.; Xu, T.; Zhuang, Y.; Xu, R.; Han, M. KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 1061–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wilhelmsen, K.; Litjens, S.H.; Kuikman, I.; Tshimbalanga, N.; Janssen, H.; van den Bout, I.; Raymond, K.; Sonnenberg, A. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 799–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ketema, M.; Wilhelmsen, K.; Kuikman, I.; Janssen, H.; Hodzic, D.; Sonnenberg, A. Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3384–3394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Postel, R.; Ketema, M.; Kuikman, I.; de Pereda, J.M.; Sonnenberg, A. Nesprin-3 augments peripheral nuclear localization of intermediate filaments in zebrafish. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 755–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ketema, M.; Kreft, M.; Secades, P.; Janssen, H.; Sonnenberg, A. Nesprin-3 connects plectin and vimentin to the nuclear envelope of Sertoli cells but is not required for Sertoli cell function in spermatogenesis. *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 2454–2466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Roux, K.J.; Crisp, M.L.; Liu, Q.; Kim, D.; Kozlov, S.; Stewart, C.L.; Burke, B. Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2194–2199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Mislaw, J.M.; Holaska, J.M.; Kim, M.S.; Lee, K.K.; Segura-Totten, M.; Wilson, K.L.; McNally, E.M. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A *in vitro*. *FEBS Lett.* **2002**, *525*, 135–140. [[CrossRef](#)]
69. Libotte, T.; Zaim, H.; Abraham, S.; Padmakumar, V.C.; Schneider, M.; Lu, W.; Munck, M.; Hutchison, C.; Wehnert, M.; Fahrenkrog, B.; *et al.* Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 3411–3424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Cain, N.E.; Starr, D.A. SUN proteins and nuclear envelope spacing. *Nucl. Austin Tex* **2015**, *6*, 2–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Lüke, Y.; Zaim, H.; Karakesisoglou, I.; Jaeger, V.M.; Sellin, L.; Lu, W.; Schneider, M.; Neumann, S.; Beijer, A.; Munck, M.; *et al.* Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1887–1898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zhang, Q.; Bethmann, C.; Worth, N.F.; Davies, J.D.; Wasner, C.; Feuer, A.; Ragnauth, C.D.; Yi, Q.; Mellad, J.A.; Warren, D.T.; *et al.* Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2816–2833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cain, N.E.; Tapley, E.C.; McDonald, K.L.; Cain, B.M.; Starr, D.A. The SUN protein UNC-84 is required only in force-bearing cells to maintain nuclear envelope architecture. *J. Cell Biol.* **2014**, *206*, 163–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Luxton, G.W.G.; Gomes, E.R.; Folker, E.S.; Vintinner, E.; Gundersen, G.G. Linear Arrays of Nuclear Envelope Proteins Harness Retrograde Actin Flow for Nuclear Movement. *Science* **2010**, *329*, 956–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chang, W.; Antoku, S.; Östlund, C.; Worman, H.J.; Gundersen, G.G. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucl. Austin Tex* **2015**, *6*, 77–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Gomes, E.R.; Jani, S.; Gundersen, G.G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **2005**, *121*, 451–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

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



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

REVUE n°2

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

Aureille Julien, Belaadi Nejma, Guilluy Christophe

(Revue publiée dans Current Opinion in Cellular Biology, 2017)

Résumé : Le noyau peut être soumis à des forces importantes générées par le cytosquelette qui affectent sa forme et sa position afin de permettre à la cellule d'exercer ses fonctions de migration, de différenciation ou de division cellulaire. De récents travaux ont démontré l'existence de mécanismes mécanosensibles dans le noyau, capable de réguler sa structure et sa fonction. Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse soient encore mal connus, il semble que l'enveloppe nucléaire joue un rôle central dans ce processus.

Ici, nous passons en revue les mécanismes nucléaires mécanosensibles et leur homologie fonctionnelle avec ceux présents à la surface cellulaire. De plus, nous discutons de leur fonctionnement durant les phases d'adhérence et de migration cellulaires, ainsi que de leur participation à l'organisation du cytosquelette, soit par contact physique direct ou par l'activation de voies de signalisation intracellulaires.



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

Julien Aureille¹, Néjma Belaadi² and Christophe Guilluy¹



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

Addresses

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

² l'institut du thorax, Inserm, CNRS, université de Nantes, 44000 Nantes, France

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

Current Opinion in Cell Biology 2016, **44**:59–67

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

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

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 26th October 2016

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

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

Introduction

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

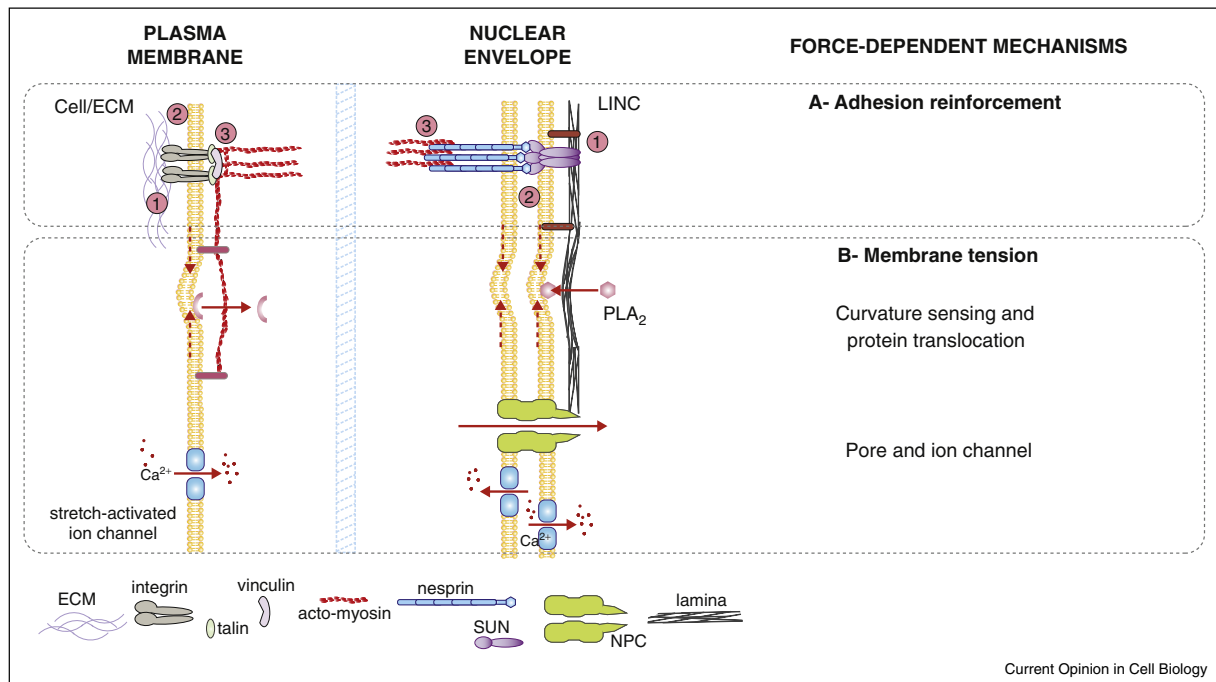
stress is applied to drive changes in nuclear shape and position.

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

The NE and the cell surface share their mechanosensitivity

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

Figure 1



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

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

LINC complex reinforcement

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

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

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

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

Nuclear membrane tension

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

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

At the PM, tension can be converted into biochemical pathways through many different modalities including, curvature sensing proteins, membrane translocation of proteins and mechanosensitive channels [31]. These structures have potential nuclear counterparts that transduce nuclear membrane tension into nuclear signaling pathways: (1) **Curvature sensing and protein translocation.** Differences in lipid composition between the NM and the PM [35] may affect the modalities of protein recruitment, favoring hydrophobic rather than electrostatic interactions [36]. The ALPS domain, a known membrane curvature sensor, has been identified in NPC component Nup133 and promotes membrane anchoring and assembly of the NPC [37]. Remarkably, a recent study demonstrates that phospholipase A2 (PLA₂) translocates from the nucleoplasm to the INM in response to excessive membrane tension following nuclear swelling [38^{**}]. In this study, the authors showed *in vivo* that this mechanotransduction mechanism triggers eicosanoid synthesis and inflammation in response to tissue damage [38^{**}] (Figure 1). Excessive NM tension can compromise nuclear integrity and cell survival, as recently observed when cells migrate in confined environment [39,40]. These studies reported that substantial physical stress is applied to the NE when cells cross tight interstitial spaces, leading to NE rupture and subsequent repair by recruitment of the endosomal sorting complexes required for transport III (ESCRT III) machinery. (2) **Mechanosensitive channels.** NPCs are large protein complexes that form aqueous channels positioned in the NE, where the ONM and INM are fused. NPCs allow nuclear import and export of molecules via passive or active diffusion and are closely linked to chromatin organization and gene expression as they facilitate mRNA export [41,42]. It has been suggested that mechanical stress transmission to the NE

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

Lamina remodeling

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

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

Force-dependent NE mechanisms during adhesion and migration

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

Adhesion to extracellular matrix

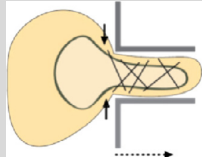
When cells adhere to flat surfaces, actomyosin filaments exerts mechanical tension to the nucleus, leading to affect its morphology, as shown by Ingber's pioneering work [54]. A dome-like actin cap, composed of contractile actin filament bundles that covers the top of the nucleus was shown to contribute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

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

Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface Aureille, Belaadi and Guilluy 63**Table 1****NE mechanosensitive mechanisms during adhesion and migration**

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

Table 1 (Continued)

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

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

Cell migration

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

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

Conclusion

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

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

Acknowledgements

We apologize to those whose work was not discussed due to space limitations. We thank Keith Burrridge, David Graham, Laurianne Van Landeghem and Lydia Pernet for their critical readings of the manuscript. C.G. is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV1-0008), from the European Union Seventh Framework Programme (Marie Curie Career Integration 8304162) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant 8639300).

References and recommended reading

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

- of special interest
- of outstanding interest

1. Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA: **Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction.** *Nature* 2011, **475**:316-323.
2. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA: **Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**:633-643.
3. Wang N, Tytell JD, Ingber DE: **Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:75-82.
4. Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, Gerace L: **Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics.** *Science* 2003, **301**:1380-1382.
5. Simon DN, Wilson KL: **The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic "network of networks."** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:695-708.
6. Luxton GWG, Gomes ER, Folker ES, Vintinner E, Gundersen GG: **Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement.** *Science* 2010, **329**:956-959.
7. Kutscheidt S, Zhu R, Antoku S, Luxton GWG, Stagljar I, Fackler OT, Gundersen GG: **FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:708-715.
8. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, Burrridge K: **Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:376-381.
9. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajewski JD, Spinler KR, Shin J-W, Tewari M, Rehfeldt F, Speicher DW, Discher DE: **Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation.** *Science* 2013, **341**:1240104.
10. Wang N, Tytell JD, Ingber DE: **Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:75-82.
11. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE: **Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:849-854.
12. Baum DA, Baum B: **An inside-out origin for the eukaryotic cell.** *BMC Biol* 2014, **12**:76.
13. Zhen Y-Y, Libotte T, Munck M, Noegel AA, Korenbaum E: **NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton.** *J Cell Sci* 2002, **115**:3207-3222.
14. Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, Karakesisoglou I: **The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope.** *J Cell Sci* 2005, **118**:3419-3430.
15. Wilhelmsen K, Litjens SHM, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A: **Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin.** *J Cell Biol* 2005, **171**:799-810.
16. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D: **Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex.** *J Cell Biol* 2006, **172**:41-53.
17. Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, Trembath RC, Shackleton S: **SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:3738-3751.
18. Schmitt J, Benavente R, Hodzic D, Höög C, Stewart CL, Alsheimer M: **Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7426-7431.
19. Berezney R, Coffey DS: **Identification of a nuclear protein matrix.** *Biochem Biophys Res Commun* 1974, **60**:1410-1417.
20. Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T: **Estimation of the mechanical connection between apical stress fibers and the nucleus in vascular smooth muscle cells cultured on a substrate.** *J Biomech* 2014, **47**:1422-1429.
21. Arsenovic PT, Ramachandran I, Bathula K, Zhu R, Narang JD, Noll NA, Lemmon CA, Gundersen GG, Conway DE: **Nesprin-2G, a component of the nuclear LINC complex, is subject to myosin-dependent tension.** *Biophys J* 2016, **110**:34-43.
22. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD: **Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.** *J Cell Biol* 2001, **153**:1175-1186.
23. Schiller HB, Hermann M-R, Polleux J, Vignaud T, Zanivan S, Friedel CC, Sun Z, Raducanu A, Gottschalk K-E, Théry M, Mann M, Fassler R: **β 1- and α v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments.** *Nat Cell Biol* 2013, **15**:625-636.
24. Huy QL, Ghatak S, Chloé Yeung C-Y, Tellkamp F, Günsschmann C, Dieterich C, Yeroslaviz A, Habermann B, Pombo A, Niessen CM, Wickström SA: **Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment.** *Nat Cell Biol* 2016.
25. Chrzanowska-Wodnicka M, Burrridge K: **Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions.** *J Cell Biol* 1996, **133**:1403-1415.
26. Sosa BA, Rothballer A, Kutay U, Schwartz TU: **LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins.** *Cell* 2012, **149**:1035-1047.
27. Nie S, Ke H, Gao F, Ren J, Wang M, Huo L, Gong W, Feng W: **Coiled-coil domains of SUN proteins as intrinsic dynamic regulators.** *Struct Lond Engl* 1993 2016, **24**:80-91.
28. Schwartz MA: **Cell biology. The force is with us.** *Science* 2009, **323**:588-589.
29. Folker ES, Ostlund C, Luxton GWG, Worman HJ, Gundersen GG: **Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:131-136.

66 Cell architecture

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

Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface Aureille, Belaadi and Guilluy 67

68. Petrie RJ, Koo H, Yamada KM: **Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix.** *Science* 2014, **345**:1062-1065.
69. Harada T, Swift J, Irianto J, Shin J-W, Spinler KR, Athirasala A, Diegmiller R, Dingal PCDP, Ivanovska IL, Discher DE: **Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival.** *J Cell Biol* 2014, **204**:669-682.

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

70. Thiam H-R, Vargas P, Carpi N, Crespo CL, Raab M, Terriac E, King MC, Jacobelli J, Alberts AS, Stradal T, Lennon-Dumenil A-M, Piel M: **Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments.** *Nat Commun* 2016, **7**:10997.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abercrombie, M., and Dunn, G.A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell Res.* 92, 57–62.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1970). The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp. Cell Res.* 59, 393–398.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L., and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323, 560–564.
- Akhmanova, A., and Hoogenraad, C.C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 47–54.
- Alam, S.G., Lovett, D., Kim, D.I., Roux, K.J., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2015). The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 128, 1901–1911.
- Alam, S.G., Zhang, Q., Prasad, N., Li, Y., Chamala, S., Kuchibhotla, R., Kc, B., Aggarwal, V., Shrestha, S., Jones, A.L., et al. (2016). The mammalian LINC complex regulates genome transcriptional responses to substrate rigidity. *Sci. Rep.* 6, 38063.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246–20249.
- Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2002). Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J. Biol. Chem.* 277, 22093–22102.
- Anderson, D.J., and Hetzer, M.W. (2008). The life cycle of the metazoan nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 386–392.
- Anderson, J.D., Lowary, P.T., and Widom, J. (2001). Effects of histone acetylation on the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J. Mol. Biol.* 307, 977–985.

- Antoku, S., Zhu, R., Kutscheidt, S., Fackler, O.T., and Gundersen, G.G. (2015). Reinforcing the LINC complex connection to actin filaments: the role of FHOD1 in TAN line formation and nuclear movement. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 2200–2205.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154, 1047–1059.
- Arsenovic, P.T., Ramachandran, I., Bathula, K., Zhu, R., Narang, J.D., Noll, N.A., Lemmon, C.A., Gundersen, G.G., and Conway, D.E. (2016). Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys. J.* 110, 34–43.
- Assoian, R.K., and Klein, E.A. (2008). Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol.* 18, 347–352.
- Athirasala, A., Hirsch, N., and Buxboim, A. (2017). Nuclear mechanotransduction: sensing the force from within. *Curr. Opin. Cell Biol.* 46, 119–127.
- Avery, N.C., and Bailey, A.J. (2005). Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 15, 231–240.
- Avolio, A., Jones, D., and Tafazzoli-Shadpour, M. (1998). Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 32, 170–175.
- Aymard, F., Aguirrebengoa, M., Guillou, E., Javierre, B.M., Bugler, B., Arnould, C., Rocher, V., Iacovoni, J.S., Biernacka, A., Skrzypczak, M., et al. (2017). Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 353–361.
- Baarlink, C., and Grosse, R. (2014). Formin' actin in the nucleus. *Nucl. Austin Tex* 5, 15–20.
- Baena-López, L.A., Baonza, A., and García-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr. Biol. CB* 15, 1640–1644.

- Baker, P.B., Baba, N., and Boesel, C.P. (1981). Cardiovascular abnormalities in progeria. Case report and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 105, 384–386.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 3, 466–472.
- Balestrini, J.L., Chaudhry, S., Sarrazy, V., Koehler, A., and Hinz, B. (2012). The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 4, 410–421.
- Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B.A., and Wehrle-Haller, B. (2001). Marching at the front and dragging behind: differential α V β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* 155, 1319–1332.
- Bamburg, J.R., Harris, H.E., and Weeds, A.G. (1980). Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett.* 121, 178–182.
- Barnes, J.M., Przybyla, L., and Weaver, V.M. (2017). Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J Cell Sci* 130, 71–82.
- Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 131, 847–860.
- Barry, S.T., and Critchley, D.R. (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 7), 2033–2045.
- Barton, L.J., Soshnev, A.A., and Geyer, P.K. (2015). Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 34, 1–8.
- Basalyga, D.M., Simionescu, D.T., Xiong, W., Baxter, B.T., Starcher, B.C., and Vyavahare, N.R. (2004). Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 110, 3480–3487.
- Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R., and Ellenberg, J. (2002). Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* 108, 83–96.

- Behrens, T.W., Jagadeesh, J., Scherle, P., Kearns, G., Yewdell, J., and Staudt, L.M. (1994). Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **153**, 682–690.
- Bement, W.M., Benink, H.A., and von Dassow, G. (2005). A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J. Cell Biol.* **170**, 91–101.
- Berginski, M.E., and Gomez, S.M. (2013). The Focal Adhesion Analysis Server: a web tool for analyzing focal adhesion dynamics. *F1000Research* **2**, 68.
- Berk, J.M., Tifft, K.E., and Wilson, K.L. (2013). The nuclear envelope LEM-domain protein emerin. *Nucl. Austin Tex* **4**, 298–314.
- Berkowitz, D.E., White, R., Li, D., Minhas, K.M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A.A., Nyhan, D., Champion, H.C., et al. (2003). Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* **108**, 2000–2006.
- Bershadsky, A.D., Balaban, N.Q., and Geiger, B. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 677–695.
- Bieling, P., Li, T.-D., Weichsel, J., McGorty, R., Jreij, P., Huang, B., Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2016). Force Feedback Controls Motor Activity and Mechanical Properties of Self-Assembling Branched Actin Networks. *Cell* **164**, 115–127.
- Birkenfeld, J., Nalbant, P., Bohl, B.P., Pertz, O., Hahn, K.M., and Bokoch, G.M. (2007). GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev. Cell* **12**, 699–712.
- Bissell, M.J., Hall, H.G., and Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.* **99**, 31–68.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol. CB* **10**, 1273–1282.
- Block, M.R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A.-P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E., and Albiges-Rizo, C. (2008). Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *Eur. J. Cell Biol.* **87**, 491–506.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801.

- Borrego-Pinto, J., Jegou, T., Osorio, D.S., Auradé, F., Gorjánácz, M., Koch, B., Mattaj, I.W., and Gomes, E.R. (2012). Samp1 is a component of TAN lines and is required for nuclear movement. *J. Cell Sci.* 125, 1099–1105.
- Bots, M.L., Hofman, A., de Bruyn, A.M., de Jong, P.T., and Grobbee, D.E. (1993). Isolated systolic hypertension and vessel wall thickness of the carotid artery. The Rotterdam Elderly Study. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* 13, 64–69.
- Boucrot, E., and Kirchhausen, T. (2008). Mammalian cells change volume during mitosis. *PloS One* 3, e1477.
- Bovellan, M., Romeo, Y., Biro, M., Boden, A., Chugh, P., Yonis, A., Vaghela, M., Fritzsche, M., Moulding, D., Thorogate, R., et al. (2014). Cellular control of cortical actin nucleation. *Curr. Biol. CB* 24, 1628–1635.
- Brangwynne, C.P., MacKintosh, F.C., Kumar, S., Geisse, N.A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K.K., Ingber, D.E., and Weitz, D.A. (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J. Cell Biol.* 173, 733–741.
- Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 586–599.
- Bringmann, H., and Hyman, A.A. (2005). A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature* 436, 731–734.
- Briones, A.M., Arribas, S.M., and Salaices, M. (2010). Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19, 187–194.
- Broder, K., Reinhardt, E., Ahern, J., Lifton, R., Tamborlane, W., and Pober, B. (1999). Elevated ambulatory blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 83, 356–360.
- Broers, J.L.V., Peeters, E.A.G., Kuijpers, H.J.H., Endert, J., Bouten, C.V.C., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T., and Ramaekers, F.C.S. (2004). Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2567–2580.
- Brooke, B.S., Bayes-Genis, A., and Li, D.Y. (2003). New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 176–181.

- Brosig, M., Ferralli, J., Gelman, L., Chiquet, M., and Chiquet-Ehrismann, R. (2010). Interfering with the connection between the nucleus and the cytoskeleton affects nuclear rotation, mechanotransduction and myogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1717–1728.
- Brüel, A., Ortoft, G., and Oxlund, H. (1998). Inhibition of cross-links in collagen is associated with reduced stiffness of the aorta in young rats. *Atherosclerosis* 140, 135–145.
- Brust-Mascher, I., Sommi, P., Cheerambathur, D.K., and Scholey, J.M. (2009). Kinesin-5-dependent poleward flux and spindle length control in *Drosophila* embryo mitosis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1749–1762.
- Buch, C., Lindberg, R., Figueroa, R., Gudise, S., Onischenko, E., and Hallberg, E. (2009). An integral protein of the inner nuclear membrane localizes to the mitotic spindle in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 122, 2100–2107.
- Burridge, K. (1981). Are stress fibres contractile? *Nature* 294, 691–692.
- Burridge, K., and Connell, L. (1983). A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *J. Cell Biol.* 97, 359–367.
- Burridge, K., and Mangeat, P. (1984). An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308, 744–746.
- Burridge, K., Molony, L., and Kelly, T. (1987). Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* 8, 211–229.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J., and De Mey, J.R. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol. CB* 8, 541–544.
- Buxboim, A., Ivanovska, I.L., and Discher, D.E. (2010). Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells “feel” outside and in? *J. Cell Sci.* 123, 297–308.
- Buxboim, A., Swift, J., Irianto, J., Spinler, K.R., Dingal, P.C.D.P., Athirasala, A., Kao, Y.-R.C., Cho, S., Harada, T., Shin, J.-W., et al. (2014). Matrix elasticity regulates lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr. Biol. CB* 24, 1909–1917.
- Cadart, C., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Le Berre, M., Piel, M., and Matthews, H.K. (2014). Exploring the function of cell shape and size during mitosis. *Dev. Cell* 29, 159–169.

- Cai, S., Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2009). Kinesin-14 Family Proteins HSET/XCTK2 Control Spindle Length by Cross-Linking and Sliding Microtubules. *Mol. Biol. Cell* 20, 1348–1359.
- Cain, N.E., and Starr, D.A. (2015). SUN proteins and nuclear envelope spacing. *Nucl. Austin Tex* 6, 2–7.
- Cain, N.E., Tapley, E.C., McDonald, K.L., Cain, B.M., and Starr, D.A. (2014). The SUN protein UNC-84 is required only in force-bearing cells to maintain nuclear envelope architecture. *J. Cell Biol.* 206, 163–172.
- Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 15, 954–963.
- Callaghan, N.I., and Lee, X.A. (2017). Extracellular matrix stiffness affects contractility in adult rat cardiomyocytes: implications for dynamic nitric oxide signalling and calcium handling. *J. Physiol.* 595, 5759–5760.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 237–251.
- Canman, J.C., Lewellyn, L., Laband, K., Smerdon, S.J., Desai, A., Bowerman, B., and Oegema, K. (2008). Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science* 322, 1543–1546.
- Cao, L.G., and Wang, Y.L. (1990). Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments. *J. Cell Biol.* 111, 1905–1911.
- Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A.M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., and Ballestrem, C. (2013). Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr. Biol. CB* 23, 271–281.
- Carlier, G., Kesel, M.D., Dufays, J.-L., and Wiame, B. (2012). Progression et transversalité: Comment (mieux) articuler les apprentissages dans les disciplines scolaires ? (Presses univ. de Louvain).
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 789–803.

- Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E.S., Fuller, M.T., Echard, A., and Payre, F. (2008). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* 180, 739–746.
- Cartwright, S., and Karakesisoglou, I. (2014). Nesprins in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 169–179.
- Castrillon, D.H., and Wasserman, S.A. (1994). Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Dev. Camb. Engl.* 120, 3367–3377.
- Cattin, C.J., Duggelin, M., Martinez-Martin, D., Gerber, C., Müller, D.J., and Stewart, M.P. (2015). Mechanical control of mitotic progression in single animal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 11258–11263.
- Cecelja, M., and Chowienczyk, P. (2012). Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc. Dis.* 1.
- Chambliss, A.B., Khatau, S.B., Erdenberger, N., Robinson, D.K., Hodzic, D., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2013). The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Sci. Rep.* 3, 1087.
- Champion, L., Linder, M.I., and Kutay, U. (2017). Cellular Reorganization during Mitotic Entry. *Trends Cell Biol.* 27, 26–41.
- Chancellor, T.J., Lee, J., Thodeti, C.K., and Lele, T. (2010). Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation. *Biophys. J.* 99, 115–123.
- Chang, W., Antoku, S., Östlund, C., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2015). Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucl. Austin Tex* 6, 77–88.
- Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., and Barford, D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484, 208–213.
- Charras, G.T., Yarrow, J.C., Horton, M.A., Mahadevan, L., and Mitchison, T.J. (2005). Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 435, 365–369.
- Chen, J., and Liu, J. (2016). Spindle Size Scaling Contributes to Robust Silencing of Mitotic Spindle Assembly Checkpoint. *Biophys. J.* 111, 1064–1077.

- Chen, C.-Y., Chi, Y.-H., Mutalif, R.A., Starost, M.F., Myers, T.G., Anderson, S.A., Stewart, C.L., and Jeang, K.-T. (2012). Accumulation of the inner nuclear envelope protein Sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies. *Cell* 149, 565–577.
- Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D., and Murray, A.W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science* 274, 242–246.
- Chen, R.H., Shevchenko, A., Mann, M., and Murray, A.W. (1998). Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* 143, 283–295.
- Chi, Y.-H., Haller, K., Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2007). Histone acetyltransferase hALP and nuclear membrane protein hsSUN1 function in decondensation of mitotic chromosomes. *J. Biol. Chem.* 282, 27447–27458.
- Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Yamane, M., Okamasa, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomeres to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* 125, 59–69.
- Chircop, M. (2014). Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases* 5.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1039–1050.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P., and Sheetz, M.P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88, 39–48.
- Chowdhury, F., Li, Y., Poh, Y.-C., Yokohama-Tamaki, T., Wang, N., and Tanaka, T.S. (2010). Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PloS One* 5, e15655.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403–1415.
- Chugh, P., Clark, A.G., Smith, M.B., Cassani, D.A.D., Dierkes, K., Ragab, A., Roux, P.P., Charras, G., Salbreux, G., and Paluch, E.K. (2017). Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat. Cell Biol.* 19, 689–697.

- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204.
- Clarke, D.L., Carruthers, A.M., Mustelin, T., and Murray, L.A. (2013). Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes. *Fibrogenesis Tissue Repair* 6, 20.
- Conrad, M.N., Lee, C.-Y., Wilkerson, J.L., and Dresser, M.E. (2007). MPS3 mediates meiotic bouquet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8863–8868.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell* (Sinauer Associates).
- Cox, T.R., and Erler, J.T. (2011). Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* 4, 165–178.
- Cramer, L.P., and Mitchison, T.J. (1997). Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. *Mol. Biol. Cell* 8, 109–119.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* 172, 41–53.
- Csiszar, K. (2001). Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 70, 1–32.
- Culurgioni, S., Alfieri, A., Pendolino, V., Laddomada, F., and Mapelli, M. (2011). Inscuteable and NuMA proteins bind competitively to Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN) during asymmetric cell divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20998–21003.
- Curtis, A.S. (1964). THE MECHANISM OF ADHESION OF CELLS TO GLASS. A STUDY BY INTERFERENCE REFLECTION MICROSCOPY. *J. Cell Biol.* 20, 199–215.
- Dahl, K.N., Scaffidi, P., Islam, M.F., Yodh, A.G., Wilson, K.L., and Misteli, T. (2006). Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10271–10276.

- Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B., and Echard, A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* 13, 981–988.
- Dao, H.H., Essalihi, R., Bouvet, C., and Moreau, P. (2005). Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc. Res.* 66, 307–317.
- Dao, V.T., Dupuy, A.G., Gavet, O., Caron, E., and de Gunzburg, J. (2009). Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *J. Cell Sci.* 122, 2996–3004.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. CB* 15, 214–225.
- Deakin, N.O., and Turner, C.E. (2008). Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.* 121, 2435–2444.
- DeBiasio, R.L., LaRocca, G.M., Post, P.L., and Taylor, D.L. (1996). Myosin II transport, organization, and phosphorylation: evidence for cortical flow/solution-contraction coupling during cytokinesis and cell locomotion. *Mol. Biol. Cell* 7, 1259–1282.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22, 832–853.
- Desai, A. (2000). Kinetochore. *Curr. Biol. CB* 10, R508.
- Desmaison, A., Frongia, C., Grenier, K., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2013). Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids. *PloS One* 8, e80447.
- Dinarina, A., Pugieux, C., Corral, M.M., Loose, M., Spatz, J., Karsenti, E., and Nédélec, F. (2009). Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell* 138, 502–513.
- Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139–1143.
- Dogterom, M., and Yurke, B. (1997). Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 278, 856–860.

- Donahue, D.A., Amraoui, S., di Nunzio, F., Kieffer, C., Porrot, F., Opp, S., Diaz-Griffero, F., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2016). SUN2 Overexpression Deforms Nuclear Shape and Inhibits HIV. *J. Virol.* *90*, 4199–4214.
- Donahue, D.A., Porrot, F., Couespel, N., and Schwartz, O. (2017). SUN2 Silencing Impairs CD4 T Cell Proliferation and Alters Sensitivity to HIV-1 Infection Independently of Cyclophilin A. *J. Virol.* *91*.
- Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., and Seals, D.R. (2007). Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ. Res.* *100*, 1659–1666.
- Douglas, M.E., Davies, T., Joseph, N., and Mishima, M. (2010). Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* *20*, 927–933.
- Du, Q., and Macara, I.G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* *119*, 503–516.
- Du, Q., Stukenberg, P.T., and Macara, I.G. (2001). A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1069–1075.
- DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 308–319.
- Dujardin, D.L., and Vallee, R.B. (2002). Dynein at the cortex. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 44–49.
- Dumbauld, D.W., Lee, T.T., Singh, A., Scrimgeour, J., Gersbach, C.A., Zamir, E.A., Fu, J., Chen, C.S., Curtis, J.E., Craig, S.W., et al. (2013). How vinculin regulates force transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9788–9793.
- Dumont, S., and Mitchison, T.J. (2009). Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol. CB* *19*, 1086–1095.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179–183.
- Dupuis, M., Soubrier, F., Brocheriou, I., Raoux, S., Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.-B., and Nadaud, S. (2004). Profiling of aortic smooth muscle cell gene expression in response to chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Circulation* *110*, 867–873.

- Egelman, E.H. (1985). The structure of F-actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6, 129–151.
- Egelman, E.H., Francis, N., and DeRosier, D.J. (1982). F-actin is a helix with a random variable twist. *Nature* 298, 131–135.
- Eide, B.L., Turck, C.W., and Escobedo, J.A. (1995). Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2819–2827.
- Ellenberg, J., Siggia, E.D., Moreira, J.E., Smith, C.L., Presley, J.F., Worman, H.J., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear Membrane Dynamics and Reassembly in Living Cells: Targeting of an Inner Nuclear Membrane Protein in Interphase and Mitosis. *J. Cell Biol.* 138, 1193–1206.
- Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepac, X., and Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nat. Cell Biol.* 18, 540–548.
- Elsdale, T., and Bard, J. (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* 54, 626–637.
- Engler, A., Bacakova, L., Newman, C., Hategan, A., Griffin, M., and Discher, D. (2004). Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys. J.* 86, 617–628.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.
- Engler, A.J., Carag-Krieger, C., Johnson, C.P., Raab, M., Tang, H.-Y., Speicher, D.W., Sanger, J.W., Sanger, J.M., and Discher, D.E. (2008). Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *J. Cell Sci.* 121, 3794–3802.
- 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. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293–298.
- Essalihi, R., Dao, H.H., Gilbert, L.-A., Bouvet, C., Semerjian, Y., McKee, M.D., and Moreau, P. (2005). Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation* 112, 1628–1635.

- Evans, N.D., Minelli, C., Gentleman, E., LaPointe, V., Patankar, S.N., Kallivretaki, M., Chen, X., Roberts, C.J., and Stevens, M.M. (2009). Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells. *Eur. Cell. Mater.* 18, 1-13; discussion 13-14.
- Eyckmans, J., and Chen, C.S. (2014). Stem cell differentiation: Sticky mechanical memory. *Nat. Mater.* 13, 542–543.
- Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., and López-Otín, C. (2010). Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 3–19.
- Fededa, J.P., and Gerlich, D.W. (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* 14, 440–447.
- Féréol, S., Fodil, R., Laurent, V.M., Balland, M., Louis, B., Pelle, G., Hénon, S., Planus, E., and Isabey, D. (2009). Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness. *Biophys. J.* 96, 2009–2022.
- Fernández-Álvarez, A., Bez, C., O'Toole, E.T., Morphey, M., and Cooper, J.P. (2016). Mitotic Nuclear Envelope Breakdown and Spindle Nucleation Are Controlled by Interphase Contacts between Centromeres and the Nuclear Envelope. *Dev. Cell* 39, 544–559.
- Figueroa, R., Gudise, S., Larsson, V., and Hallberg, E. (2010). A transmembrane inner nuclear membrane protein in the mitotic spindle. *Nucl. Austin Tex* 1, 249–253.
- Finger, F.P. (2002). One ring to bind them. Septins and actin assembly. *Dev. Cell* 3, 761–763.
- Fink, J., Carpi, N., Betz, T., Bétard, A., Chebah, M., Azioune, A., Bornens, M., Sykes, C., Fetler, L., Cuvelier, D., et al. (2011). External forces control mitotic spindle positioning. *Nat. Cell Biol.* 13, 771–778.
- Fischer-Friedrich, E., Hyman, A.A., Jülicher, F., Müller, D.J., and Helenius, J. (2014). Quantification of surface tension and internal pressure generated by single mitotic cells. *Sci. Rep.* 4, 6213.
- Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., and Huttner, W.B. (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10438–10443.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (Vogel).

- Floyd, S., Whiffin, N., Gavilan, M.P., Kutscheidt, S., De Luca, M., Marcozzi, C., Min, M., Watkins, J., Chung, K., Fackler, O.T., et al. (2013). Spatiotemporal organization of Aurora-B by APC/CCdh1 after mitosis coordinates cell spreading through FHOD1. *J. Cell Sci.* 126, 2845–2856.
- Foisner, R., and Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267–1279.
- Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 25–37.
- Folker, E.S., Ostlund, C., Luxton, G.W.G., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2011). Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 131–136.
- Folkman, J., and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345–349.
- Fortunier, R. Comportement mécanique des matériaux.
- Franke, W.W., Scheer, U., Krohne, G., and Jarasch, E.D. (1981). The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J. Cell Biol.* 91, 39s–50s.
- Franklin, S.S. (2006). Hypertension in older people: part 1. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* 8, 444–449.
- Franklin, S.S., Gustin, W., Wong, N.D., Larson, M.G., Weber, M.A., Kannel, W.B., and Levy, D. (1997). Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation* 96, 308–315.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–4200.
- Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2011). Nuclear mechanics during cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 55–64.
- Friedland, J.C., Lee, M.H., and Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* 323, 642–644.
- Frohnert, C., Schweizer, S., and Hoyer-Fender, S. (2011). SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 207–218.

- Fujibuchi, T., Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Kamei, Y., Murase, R., Ueda, N., Shigemoto, K., Yamamoto, H., and Kito, K. (2005). AIP1/WDR1 supports mitotic cell rounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 268–275.
- Fujiwara, K., Porter, M.E., and Pollard, T.D. (1978). Alpha-actinin localization in the cleavage furrow during cytokinesis. *J. Cell Biol.* 79, 268–275.
- Gachet, Y., Tournier, S., Millar, J.B., and Hyams, J.S. (2001). A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature* 412, 352–355.
- Gaetz, J., and Kapoor, T.M. (2004). Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* 166, 465–471.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* 159, 695–705.
- Galis, Z.S., and Khatiri, J.J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* 90, 251–262.
- Ganem, N.J., Godinho, S.A., and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278–282.
- Gao, Y., Sirinakis, G., and Zhang, Y. (2011). Highly anisotropic stability and folding kinetics of a single coiled coil protein under mechanical tension. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12749–12757.
- Gardberg, M., Kaipio, K., Lehtinen, L., Mikkonen, P., Heuser, V.D., Talvinen, K., Iljin, K., Kampf, C., Uhlen, M., Grénman, R., et al. (2013). FHOD1, a formin upregulated in epithelial-mesenchymal transition, participates in cancer cell migration and invasion. *PloS One* 8, e74923.
- Gardel, M.L., Shin, J.H., MacKintosh, F.C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., and Weitz, D.A. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science* 304, 1301–1305.
- Gardel, M.L., Nakamura, F., Hartwig, J.H., Crocker, J.C., Stossel, T.P., and Weitz, D.A. (2006). Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1762–1767.
- Gasteier, J.E., Madrid, R., Krautkrämer, E., Schröder, S., Muranyi, W., Benichou, S., and Fackler, O.T. (2003). Activation of the Rac-binding Partner FHOD1 Induces Actin Stress Fibers via a ROCK-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 38902–38912.

- Gavet, O., and Pines, J. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev. Cell* 18, 533–543.
- Gay, O., Nakamura, F., and Baudier, J. (2011). Refilin holds the cap. *Commun. Integr. Biol.* 4, 791–795.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793–805.
- Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 21–33.
- Gennaro, G., Ménard, C., Giasson, E., Michaud, S.-E., Palasis, M., Meloche, S., and Rivard, A. (2003). Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 204–210.
- Georgatos, S.D., Pyrpasopoulou, A., and Theodoropoulos, P.A. (1997). Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 17), 2129–2140.
- Georges, P.C., Hui, J.-J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., and Wells, R.G. (2007). Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G1147-1154.
- Gerace, L., and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277–287.
- Gerace, L., Blum, A., and Blobel, G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J. Cell Biol.* 79, 546–566.
- Ghassemi, S., Meacci, G., Liu, S., Gondarenko, A.A., Mathur, A., Roca-Cusachs, P., Sheetz, M.P., and Hone, J. (2012). Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5328–5333.
- Giannone, G., and Sheetz, M.P. (2006). Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol.* 16, 213–223.

- Gibson, W.T., Veldhuis, J.H., Rubinstein, B., Cartwright, H.N., Perrimon, N., Brodland, G.W., Nagpal, R., and Gibson, M.C. (2011). Control of the mitotic cleavage plane by local epithelial topology. *Cell* 144, 427–438.
- Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L., Magnusson, K.E.G., Sacco, A., Leonardi, N.A., Kraft, P., Nguyen, N.K., Thrun, S., Lutolf, M.P., and Blau, H.M. (2010). Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 329, 1078–1081.
- Gineyts, E., Cloos, P.A., Borel, O., Grimaud, L., Delmas, P.D., and Garnero, P. (2000). Racemization and isomerization of type I collagen C-telopeptides in human bone and soft tissues: assessment of tissue turnover. *Biochem. J.* 345 Pt 3, 481–485.
- Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and Howard, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120, 923–934.
- Glotzer, M. (2009). The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 9–20.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132–138.
- Göb, E., Schmitt, J., Benavente, R., and Alsheimer, M. (2010). Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PloS One* 5, e12072.
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.-L., Guillemot, F., Dragatsis, I., et al. (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406.
- Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., et al. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8963–8968.
- Gong, J., Zhang, D., Tseng, Y., Li, B., Wirtz, D., and Schafer, B.W. (2013). Form-finding model shows how cytoskeleton network stiffness is realized. *PloS One* 8, e77417.

- Good, M.C., Vahey, M.D., Skandarajah, A., Fletcher, D.A., and Heald, R. (2013). Cytoplasmic volume modulates spindle size during embryogenesis. *Science* 342, 856–860.
- Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res.* 339, 247–257.
- Goshima, G., and Scholey, J.M. (2010). Control of mitotic spindle length. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 21–57.
- Grady, R.M., Starr, D.A., Ackerman, G.L., Sanes, J.R., and Han, M. (2005). Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4359–4364.
- Graumann, K., Runions, J., and Evans, D.E. (2010). Characterization of SUN-domain proteins at the higher plant nuclear envelope. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 61, 134–144.
- Grill, S.W., Howard, J., Schäffer, E., Stelzer, E.H.K., and Hyman, A.A. (2003). The distribution of active force generators controls mitotic spindle position. *Science* 301, 518–521.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., and Wilson, K.L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 21–31.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E.A., and Barr, F.A. (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J. Cell Biol.* 166, 167–172.
- Guild, J., Ginzberg, M.B., Hueschen, C.L., Mitchison, T.J., and Dumont, S. (2017). Increased lateral microtubule contact at the cell cortex is sufficient to drive mammalian spindle elongation. *Mol. Biol. Cell* 28, 1975–1983.
- Guilluy, C., Swaminathan, V., Garcia-Mata, R., O'Brien, E.T., Superfine, R., and Burridge, K. (2011). The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat. Cell Biol.* 13, 722–727.
- Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., and Burridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* 16, 376–381.
- Güttinger, S., Laurell, E., and Kutay, U. (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 178–191.

- Hagan, I., and Yanagida, M. (1995). The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J. Cell Biol.* 129, 1033–1047.
- Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H.C., Waizenegger, I.C., Peters, J.-M., and Pines, J. (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J. Cell Biol.* 157, 1125–1137.
- Halder, G., Dupont, S., and Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 591–600.
- Hale, C.M., Shrestha, A.L., Khatau, S.B., Stewart-Hutchinson, P.J., Hernandez, L., Stewart, C.L., Hodzic, D., and Wirtz, D. (2008). Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models. *Biophys. J.* 95, 5462–5475.
- Halfter, W., Oertle, P., Monnier, C.A., Camenzind, L., Reyes-Lua, M., Hu, H., Candiello, J., Labilloy, A., Balasubramani, M., Henrich, P.B., et al. (2015). New concepts in basement membrane biology. *FEBS J.* 282, 4466–4479.
- Hallmann, R., Zhang, X., Di Russo, J., Li, L., Song, J., Hannocks, M.-J., and Sorokin, L. (2015). The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 36, 54–61.
- Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D., and Dominiczak, A.F. (2001). Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 37, 529–534.
- Hannemann, S., Madrid, R., Stastna, J., Kitzing, T., Gasteier, J., Schönichen, A., Bouchet, J., Jimenez, A., Geyer, M., Grosse, R., et al. (2008). The Diaphanous-related Formin FHOD1 associates with ROCK1 and promotes Src-dependent plasma membrane blebbing. *J. Biol. Chem.* 283, 27891–27903.
- Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C., and Shackleton, S. (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3738–3751.
- Haque, F., Mazzeo, D., Patel, J.T., Smallwood, D.T., Ellis, J.A., Shanahan, C.M., and Shackleton, S. (2010). Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J. Biol. Chem.* 285, 3487–3498.

- Harper, L., Golubovskaya, I., and Cande, W.Z. (2004). A bouquet of chromosomes. *J. Cell Sci.* 117, 4025–4032.
- Harris, A. (1973). Location of cellular adhesions to solid substrata. *Dev. Biol.* 35, 97–114.
- Harris, A.K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 208, 177–179.
- He, L., Chen, W., Wu, P.-H., Jimenez, A., Wong, B.S., San, A., Konstantopoulos, K., and Wirtz, D. (2016). Local 3D matrix confinement determines division axis through cell shape. *Oncotarget* 7, 6994–7011.
- Heald, R., and Khodjakov, A. (2015). Thirty years of search and capture: The complex simplicity of mitotic spindle assembly. *J Cell Biol* 211, 1103–1111.
- Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579–589.
- Heck, J.N., Ponik, S.M., Garcia-Mendoza, M.G., Pehlke, C.A., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., and Keely, P.J. (2012). Microtubules regulate GEF-H1 in response to extracellular matrix stiffness. *Mol. Biol. Cell* 23, 2583–2592.
- Hendricks, A.G., Lazarus, J.E., Perlson, E., Gardner, M.K., Odde, D.J., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2012). Dynein tethers and stabilizes dynamic microtubule plus ends. *Curr. Biol. CB* 22, 632–637.
- Heo, S.-J., Thorpe, S.D., Driscoll, T.P., Duncan, R.L., Lee, D.A., and Mauck, R.L. (2015). Biophysical Regulation of Chromatin Architecture Instills a Mechanical Memory in Mesenchymal Stem Cells. *Sci. Rep.* 5, 16895.
- Herreros, L., Rodríguez-Fernandez, J.L., Brown, M.C., Alonso-Lebrero, J.L., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Longo, N., Turner, C.E., and Sánchez-Mateos, P. (2000). Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 275, 26436–26440.
- Hertwig, O. (1884). *Das Problem der Befruchtung und der Isotropie des Eies, eine Theorie der Vererbung* (Fischer).
- Hirota, T., Morisaki, T., Nishiyama, Y., Marumoto, T., Tada, K., Hara, T., Masuko, N., Inagaki, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2000). Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor. *J. Cell Biol.* 149, 1073–1086.

- Hodzic, D.M., Yeater, D.B., Bengtsson, L., Otto, H., and Stahl, P.D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J. Biol. Chem.* 279, 25805–25812.
- Hoffman, B.D., Grashoff, C., and Schwartz, M.A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 316–323.
- Horn, H.F. (2014). LINC Complex Proteins in Development and Disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 109, 287–321.
- Horn, H.F., Brownstein, Z., Lenz, D.R., Shivatzki, S., Dror, A.A., Dagan-Rosenfeld, O., Friedman, L.M., Roux, K.J., Kozlov, S., Jeang, K.-T., et al. (2013). The LINC complex is essential for hearing. *J. Clin. Invest.* 123, 740–750.
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C., and Burridge, K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* 320, 531–533.
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* 155, 1159–1172.
- Hsieh, T.-H., Chien, C.-L., Lee, Y.-H., Lin, C.-I., Hsieh, J.-Y., Chao, M.-E., Liu, D.-J., Chu, S.-S., Chen, W., Lin, S.-C., et al. (2014). Downregulation of SUN2, a novel tumor suppressor, mediates miR-221/222-induced malignancy in central nervous system embryonal tumors. *Carcinogenesis*.
- Huang, X., Yang, N., Fiore, V.F., Barker, T.H., Sun, Y., Morris, S.W., Ding, Q., Thannickal, V.J., and Zhou, Y. (2012). Matrix Stiffness–Induced Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Intrinsic Mechanotransduction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47, 340–348.
- Hümmer, S., and Mayer, T.U. (2009). Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Curr. Biol. CB* 19, 607–612.
- Humphrey, J.D., Milewicz, D.M., Tellides, G., and Schwartz, M.A. (2014). Cell biology. Dysfunctional mechanosensing in aneurysms. *Science* 344, 477–479.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903.

- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179, 1043–1057.
- Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48, 549–554.
- Hynes, R.O. (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* 326, 1216–1219.
- Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a004903.
- Icard-Arcizet, D., Cardoso, O., Richert, A., and Hénon, S. (2008). Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophys. J.* 94, 2906–2913.
- Ihalainen, T.O., Aires, L., Herzog, F.A., Schwartlander, R., Moeller, J., and Vogel, V. (2015). Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat. Mater.* 14, 1252–1261.
- Inoué, S., and Salmon, E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol. Biol. Cell* 6, 1619–1640.
- Inoué, S., and Sato, H. (1967). Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J. Gen. Physiol.* 50, Suppl:259-292.
- Iskratsch, T., Wolfenson, H., and Sheetz, M.P. (2014). Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 825–833.
- Issa, R., Zhou, X., Constandinou, C.M., Fallowfield, J., Millward-Sadler, H., Gaca, M.D.A., Sands, E., Suliman, I., Trim, N., Knorr, A., et al. (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 126, 1795–1808.
- Izzard, C.S., and Lochner, L.R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell Sci.* 21, 129–159.

- Jacob, M.P. (2003). Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 57, 195–202.
- Jacob, M.-P. (2006). [Extracellular matrix and vascular ageing]. *Med. Sci. MS* 22, 273–278.
- Jahed, Z., Shams, H., and Mofrad, M.R.K. (2015). A Disulfide Bond Is Required for the Transmission of Forces through SUN-KASH Complexes. *Biophys. J.* 109, 501–509.
- Jalali, S., del Pozo, M.A., Chen, K., Miao, H., Li, Y., Schwartz, M.A., Shyy, J.Y., and Chien, S. (2001). Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1042–1046.
- Jaspersen, S.L., Giddings, T.H., and Winey, M. (2002). Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *J. Cell Biol.* 159, 945–956.
- Jiang, H. (2015). Cell size modulates oscillation, positioning and length of mitotic spindles. *Sci. Rep.* 5, 10504.
- Johansen, K.M., and Johansen, J. (2007). Cell and molecular biology of the spindle matrix. *Int. Rev. Cytol.* 263, 155–206.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., and Boot-Handford, R.P. (2007). Collagens at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 1955–1958.
- Kagan, H.M. (2000). Intra- and extracellular enzymes of collagen biosynthesis as biological and chemical targets in the control of fibrosis. *Acta Trop.* 77, 147–152.
- Kaitna, S., Mendoza, M., Jantsch-Plunger, V., and Glotzer, M. (2000). Incenp and an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 10, 1172–1181.
- Kaji, N., Muramoto, A., and Mizuno, K. (2008). LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J. Biol. Chem.* 283, 4983–4992.
- Karnik, S.K., Brooke, B.S., Bayes-Genis, A., Sorensen, L., Wythe, J.D., Schwartz, R.S., Keating, M.T., and Li, D.Y. (2003). A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Dev. Camb. Engl.* 130, 411–423.

- Katsumi, A., Orr, A.W., Tzima, E., and Schwartz, M.A. (2004). Integrins in mechanotransduction. *J. Biol. Chem.* 279, 12001–12004.
- Kaushik, R., Yu, F., Chia, W., Yang, X., and Bahri, S. (2003). Subcellular localization of LGN during mitosis: evidence for its cortical localization in mitotic cell culture systems and its requirement for normal cell cycle progression. *Mol. Biol. Cell* 14, 3144–3155.
- Ketema, M., Wilhelmsen, K., Kuikman, I., Janssen, H., Hodzic, D., and Sonnenberg, A. (2007). Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell Sci.* 120, 3384–3394.
- Ketema, M., Kreft, M., Secades, P., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2013). Nesprin-3 connects plectin and vimentin to the nuclear envelope of Sertoli cells but is not required for Sertoli cell function in spermatogenesis. *Mol. Biol. Cell* 24, 2454–2466.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., and Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19017–19022.
- Khatiwala, C.B., Kim, P.D., Peyton, S.R., and Putnam, A.J. (2009). ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 24, 886–898.
- Kielty, C.M. (2006). Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 8, 1–23.
- Kim, D.-H., Khatau, S.B., Feng, Y., Walcott, S., Sun, S.X., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2012). Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci. Rep.* 2, 555.
- Kim, D.-H., Cho, S., and Wirtz, D. (2014). Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *J. Cell Sci.* 127, 2528–2541.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245–248.
- King, S.J., Nowak, K., Suryavanshi, N., Holt, I., Shanahan, C.M., and Ridley, A.J. (2014). Nesprin-1 and nesprin-2 regulate endothelial cell shape and migration. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 71, 423–434.

- Kirschner, M., and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329–342.
- Kitagawa, M., Fung, S.Y.S., Hameed, U.F.S., Goto, H., Inagaki, M., and Lee, S.H. (2014). Cdk1 coordinates timely activation of MKlp2 kinesin with relocation of the chromosome passenger complex for cytokinesis. *Cell Rep.* 7, 166–179.
- Kittel, C. (1958). *Introduction a la physique de l'etat solide* (Dunod).
- Kiyomitsu, T., and Cheeseman, I.M. (2012). Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation. *Nat. Cell Biol.* 14, 311–317.
- Klein, E.A., Yin, L., Kothapalli, D., Castagnino, P., Byfield, F.J., Xu, T., Levental, I., Hawthorne, E., Janmey, P.A., and Assoian, R.K. (2009). Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Curr. Biol. CB* 19, 1511–1518.
- Konova, E., Baydanoff, S., Atanasova, M., and Velkova, A. (2004). Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Exp. Gerontol.* 39, 249–254.
- Kops, G.J.P.L., Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5, 773–785.
- Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Inagaki, M. (2000). Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* 19, 6059–6064.
- Kotak, S., and Gönczy, P. (2013). Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 741–748.
- Kotak, S., Busso, C., and Gönczy, P. (2012). Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells. *J. Cell Biol.* 199, 97–110.
- Kotak, S., Busso, C., and Gönczy, P. (2013). NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function. *EMBO J.* 32, 2517–2529.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., and Echard, A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 16, 1719–1725.
- Kovacic, J.C., Moreno, P., Nabel, E.G., Hachinski, V., and Fuster, V. (2011). Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation* 123, 1900–1910.

- Kozel, B.A., Danback, J.R., Waxler, J.L., Knutsen, R.H., de Las Fuentes, L., Reusz, G.S., Kis, E., Bhatt, A.B., and Pober, B.R. (2014). Williams syndrome predisposes to vascular stiffness modified by antihypertensive use and copy number changes in NCF1. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 63, 74–79.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1942–1952.
- Kracklauer, M.P., Banks, S.M.L., Xie, X., Wu, Y., and Fischer, J.A. (2007). *Drosophila* klaroid encodes a SUN domain protein required for Klarsicht localization to the nuclear envelope and nuclear migration in the eye. *Fly (Austin)* 1, 75–85.
- Kracklauer, M.P., Wiora, H.M., Deery, W.J., Chen, X., Bolival, B., Romanowicz, D., Simonette, R.A., Fuller, M.T., Fischer, J.A., and Beckingham, K.M. (2010). The *Drosophila* SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *J. Cell Sci.* 123, 2763–2772.
- Krause, M., and Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 577–590.
- Kshitiz, null, Hubbi, M.E., Ahn, E.H., Downey, J., Afzal, J., Kim, D.-H., Rey, S., Chang, C., Kundu, A., Semenza, G.L., et al. (2012). Matrix rigidity controls endothelial differentiation and morphogenesis of cardiac precursors. *Sci. Signal.* 5, ra41.
- Kühn, S., and Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases* 5, e29513.
- Kumar, A., Ouyang, M., Van den Dries, K., McGhee, E.J., Tanaka, K., Anderson, M.D., Groisman, A., Goult, B.T., Anderson, K.I., and Schwartz, M.A. (2016). Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity. *J. Cell Biol.* 213, 371–383.
- Kumeta, M., Gilmore, J.L., Umeshima, H., Ishikawa, M., Kitajiri, S., Horigome, T., Kengaku, M., and Takeyasu, K. (2014). Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 19, 338–349.
- Kunda, P., and Baum, B. (2009). The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol.* 19, 174–179.

- Kunda, P., Pelling, A.E., Liu, T., and Baum, B. (2008). Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr. Biol. CB* 18, 91–101.
- Kunda, P., Rodrigues, N.T.L., Moeendarbary, E., Liu, T., Ivetic, A., Charras, G., and Baum, B. (2012). PP1-mediated moesin dephosphorylation couples polar relaxation to mitotic exit. *Curr. Biol. CB* 22, 231–236.
- Kuo, J.-C., Han, X., Hsiao, C.-T., Yates, J.R., and Waterman, C.M. (2011). Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* 13, 383–393.
- Kuroda, M., Wada, H., Kimura, Y., Ueda, K., and Kioka, N. (2017). Vinculin promotes nuclear localization of TAZ to inhibit ECM stiffness-dependent differentiation into adipocytes. *J. Cell Sci.* 130, 989–1002.
- Kutscheidt, S., Zhu, R., Antoku, S., Luxton, G.W.G., Stagljär, I., Fackler, O.T., and Gundersen, G.G. (2014). FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement. *Nat. Cell Biol.* 16, 708–715.
- Kwon, M., Godinho, S.A., Chandhok, N.S., Ganem, N.J., Azioune, A., Thery, M., and Pellman, D. (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev.* 22, 2189–2203.
- Kwon, M., Bagonis, M., Danuser, G., and Pellman, D. (2015). Direct Microtubule-Binding by Myosin-10 Orients Centrosomes toward Retraction Fibers and Subcortical Actin Clouds. *Dev. Cell* 34, 323–337.
- L. Hutter, J., and Bechhoefer, J. (1993). Calibration of Atomic-Force Microscope Tips. *Rev. Sci. Instrum.* 64, 1868–1873.
- Laan, L., Pavin, N., Husson, J., Romet-Lemonne, G., van Duijn, M., López, M.P., Vale, R.D., Jülicher, F., Reck-Peterson, S.L., and Dogterom, M. (2012). Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters. *Cell* 148, 502–514.
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., and Michel, J.-B. (2012). The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* 95, 194–204.
- LaFlamme, S.E., Nieves, B., Colello, D., and Reverte, C.G. (2008). Integrins as regulators of the mitotic machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 576–582.

- Lammerding, J., Schulze, P.C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R.D., Stewart, C.L., and Lee, R.T. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* 113, 370–378.
- Lancaster, O.M., and Baum, B. (2011). Might makes right: Using force to align the mitotic spindle. *Nat. Cell Biol.* 13, 736–738.
- Lancaster, O.M., Le Berre, M., Dimitracopoulos, A., Bonazzi, D., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Picone, R., Duke, T., Piel, M., and Baum, B. (2013). Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Dev. Cell* 25, 270–283.
- Lanzer, P., Boehm, M., Sorribas, V., Thiriet, M., Janzen, J., Zeller, T., St Hilaire, C., and Shanahan, C. (2014). Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur. Heart J.* 35, 1515–1525.
- Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* 388, 78–82.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. CB* 22, R966-980.
- Laurell, E., Beck, K., Krupina, K., Theerthagiri, G., Bodenmiller, B., Horvath, P., Aebersold, R., Antonin, W., and Kutay, U. (2011). Phosphorylation of Nup98 by multiple kinases is crucial for NPC disassembly during mitotic entry. *Cell* 144, 539–550.
- Laurent, S., Boutouyrie, P., and Lacolley, P. (2005). Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 45, 1050–1055.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275–280.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73–84.
- Lee, S.E., Kamm, R.D., and Mofrad, M.R.K. (2007). Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *J. Biomech.* 40, 2096–2106.
- Legate, K.R., Montañez, E., Kudlacek, O., and Fässler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 20–31.
- Legate, K.R., Wickström, S.A., and Fässler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397–418.

- Lehto, V.P., Virtanen, I., and Kurki, P. (1978). Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts. *Nature* 272, 175–177.
- Lei, K., Zhang, X., Ding, X., Guo, X., Chen, M., Zhu, B., Xu, T., Zhuang, Y., Xu, R., and Han, M. (2009). SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10207–10212.
- Lei, K., Zhu, X., Xu, R., Shao, C., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2012). Inner nuclear envelope proteins SUN1 and SUN2 play a prominent role in the DNA damage response. *Curr. Biol. CB* 22, 1609–1615.
- Lemarié, C.A., Tharaux, P.-L., and Lehoux, S. (2010). Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 433–439.
- Levayer, R., and Lecuit, T. (2012). Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* 22, 61–81.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906.
- Lew, D.J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 648–653.
- Li, J., and Jiang, H. (2017). Geometric Asymmetry Induces Upper Limit of Mitotic Spindle Size. *Biophys. J.* 112, 1503–1516.
- Li, D.Y., Faury, G., Taylor, D.G., Davis, E.C., Boyle, W.A., Mecham, R.P., Stenzel, P., Boak, B., and Keating, M.T. (1998). Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J. Clin. Invest.* 102, 1783–1787.
- Li, P., Meinke, P., Huong, L.T.T., Wehnert, M., and Noegel, A.A. (2014). Contribution of SUN1 mutations to the pathomechanism in muscular dystrophies. *Hum. Mutat.* 35, 452–461.
- Li, P., Stumpf, M., Müller, R., Eichinger, L., Glöckner, G., and Noegel, A.A. (2017). The function of the inner nuclear envelope protein SUN1 in mRNA export is regulated by phosphorylation. *Sci. Rep.* 7, 9157.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., et al. (2005). Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol. Biol. Cell* 16, 3411–3424.

- Lim, M.A., and Townsend, R.R. (2009). Arterial compliance in the elderly: its effect on blood pressure measurement and cardiovascular outcomes. *Clin. Geriatr. Med.* 25, 191–205.
- Lindeman, R.E., and Pelegri, F. (2012). Localized products of futile cycle/lrmp promote centrosome-nucleus attachment in the zebrafish zygote. *Curr. Biol. CB* 22, 843–851.
- Link, J., Leubner, M., Schmitt, J., Göb, E., Benavente, R., Jeang, K.-T., Xu, R., and Alsheimer, M. (2014). Analysis of meiosis in SUN1 deficient mice reveals a distinct role of SUN2 in mammalian meiotic LINC complex formation and function. *PLoS Genet.* 10, e1004099.
- Link, J., Jahn, D., and Alsheimer, M. (2015). Structural and functional adaptations of the mammalian nuclear envelope to meet the meiotic requirements. *Nucl. Austin Tex* 6, 93–101.
- Liu, L., Luo, Q., Sun, J., and Song, G. (2016). Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. *Exp. Cell Res.* 348, 56–65.
- Liu, S., Calderwood, D.A., and Ginsberg, M.H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20), 3563–3571.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79, 144–152.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman).
- Löhler, J., Timpl, R., and Jaenisch, R. (1984). Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* 38, 597–607.
- Lombardi, M.L., Jaalouk, D.E., Shanahan, C.M., Burke, B., Roux, K.J., and Lammerding, J. (2011). The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 286, 26743–26753.
- Lottersberger, F., Karssemeijer, R.A., Dimitrova, N., and de Lange, T. (2015). 53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair. *Cell* 163, 880–893.
- Lovett, D.B., Shekhar, N., Nickerson, J.A., Roux, K.J., and Lele, T.P. (2013). Modulation of Nuclear Shape by Substrate Rigidity. *Cell. Mol. Bioeng.* 6, 230–238.

- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012a). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395–406.
- Lu, W., Gotzmann, J., Sironi, L., Jaeger, V.-M., Schneider, M., Lüke, Y., Uhlén, M., Szigartyo, C.A.-K., Brachner, A., Ellenberg, J., et al. (2008). Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 2415–2426.
- Lu, W., Schneider, M., Neumann, S., Jaeger, V.-M., Taranum, S., Munck, M., Cartwright, S., Richardson, C., Carthew, J., Noh, K., et al. (2012b). Nesprin interchain associations control nuclear size. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 3493–3509.
- Lucero, H.A., and Kagan, H.M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 2304–2316.
- Lüke, Y., Zaim, H., Karakesisoglou, I., Jaeger, V.M., Sellin, L., Lu, W., Schneider, M., Neumann, S., Beijer, A., Munck, M., et al. (2008). Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J. Cell Sci.* 121, 1887–1898.
- Luo, X., Fang, G., Coldiron, M., Lin, Y., Yu, H., Kirschner, M.W., and Wagner, G. (2000). Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat. Struct. Biol.* 7, 224–229.
- Luo, Y., Ran, J., Xie, S., Yang, Y., Chen, J., Li, S., Shui, W., Li, D., Liu, M., and Zhou, J. (2016). ASK1 controls spindle orientation and positioning by phosphorylating EB1 and stabilizing astral microtubules. *Cell Discov.* 2, 16033.
- Luxenburg, C., Pasolli, H.A., Williams, S.E., and Fuchs, E. (2011). Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation. *Nat. Cell Biol.* 13, 203–214.
- Luxton, G.W.G., Gomes, E.R., Folker, E.S., Vintinner, E., and Gundersen, G.G. (2010). Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science* 329, 956–959.
- Luxton, G.W.G., Gomes, E.R., Folker, E.S., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2011). TAN lines: a novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. *Nucl. Austin Tex* 2, 173–181.

- Lv, X., Liu, L., Cheng, C., Yu, B., Xiong, L., Hu, K., Tang, J., Zeng, L., and Sang, Y. (2015). SUN2 exerts tumor suppressor functions by suppressing the Warburg effect in lung cancer. *Sci. Rep.* 5, 17940.
- Ma, L., Tsai, M.-Y., Wang, S., Lu, B., Chen, R., Yates, J.R., Zhu, X., and Zheng, Y. (2009). Requirement for Nudel and dynein for assembly of the lamin B spindle matrix. *Nat. Cell Biol.* 11, 247–256.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* 127, 107–115.
- Machicoane, M., de Frutos, C.A., Fink, J., Rocancourt, M., Lombardi, Y., Garel, S., Piel, M., and Echard, A. (2014). SLK-dependent activation of ERMs controls LGN-NuMA localization and spindle orientation. *J. Cell Biol.* 205, 791–799.
- Maddox, A.S., and Burridge, K. (2003). RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* 160, 255–265.
- Maddox, A.S., Lewellyn, L., Desai, A., and Oegema, K. (2007). Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow. *Dev. Cell* 12, 827–835.
- Maier, B., Kirsch, M., Anderhub, S., Zentgraf, H., and Krämer, A. (2013). The novel actin/focal adhesion-associated protein MISP is involved in mitotic spindle positioning in human cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1457–1471.
- Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat. Cell Biol.* 13, 475–482.
- Malone, C.J., Fixsen, W.D., Horvitz, H.R., and Han, M. (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3171–3181.
- Maninová, M., and Vomastek, T. (2016). Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts. *FEBS J.* 283, 3676–3693.
- Maninová, M., Klímová, Z., Parsons, J.T., Weber, M.J., Iwanicki, M.P., and Vomastek, T. (2013). The reorientation of cell nucleus promotes the establishment of front-rear polarity in migrating fibroblasts. *J. Mol. Biol.* 425, 2039–2055.
- Maninova, M., Caslavsky, J., and Vomastek, T. (2017). The assembly and function of perinuclear actin cap in migrating cells. *Protoplasma* 254, 1207–1218.

- Maniotis, A.J., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 849–854.
- Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S., and Musacchio, A. (2007). The Mad2 conformational dimer: structure and implications for the spindle assembly checkpoint. *Cell* 131, 730–743.
- Maquart, F.X., Bellon, G., Pasco, S., and Monboisse, J.C. (2005). Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 87, 353–360.
- Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *J. Cell Biol.* 184, 373–381.
- Mastronarde, D.N., McDonald, K.L., Ding, R., and McIntosh, J.R. (1993). Interpolar spindle microtubules in PTK cells. *J. Cell Biol.* 123, 1475–1489.
- Matsumoto, A., Hieda, M., Yokoyama, Y., Nishioka, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., and Matsuura, N. (2015). Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer. *Cancer Med.* 4, 1547–1557.
- Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* 15, 371–377.
- Matsumura, S., Hamasaki, M., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Sato, M., Nishida, E., and Toyoshima, F. (2012). ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. *Nat. Commun.* 3, 626.
- Mattar, S.G., Kumar, A.G., and Lumsden, A.B. (1994). Vascular complications in Ehlers-Danlos syndrome. *Am. Surg.* 60, 827–831.
- Matthews, H.K., Delabre, U., Rohn, J.L., Guck, J., Kunda, P., and Baum, B. (2012). Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression. *Dev. Cell* 23, 371–383.
- Matzke, R., Jacobson, K., and Radmacher, M. (2001). Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 607–610.
- Mayer, M., Depken, M., Bois, J.S., Jülicher, F., and Grill, S.W. (2010). Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature* 467, 617–621.

- McCloy, R.A., Rogers, S., Caldon, C.E., Lorca, T., Castro, A., and Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 13, 1400–1412.
- McDaniel, D.P., Shaw, G.A., Elliott, J.T., Bhadriraju, K., Meuse, C., Chung, K.-H., and Plant, A.L. (2007). The stiffness of collagen fibrils influences vascular smooth muscle cell phenotype. *Biophys. J.* 92, 1759–1769.
- McDonald, K.L., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., and McIntosh, J.R. (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells. *J. Cell Biol.* 118, 369–383.
- McIntosh, J.R. (1991). Structural and mechanical control of mitotic progression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56, 613–619.
- McMillan, J.N., Sia, R.A., and Lew, D.J. (1998). A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *J. Cell Biol.* 142, 1487–1499.
- Meadows, J.C., and Millar, J. (2008). Latrunculin A delays anaphase onset in fission yeast by disrupting an Ase1-independent pathway controlling mitotic spindle stability. *Mol. Biol. Cell* 19, 3713–3723.
- Meinke, P., Mattioli, E., Haque, F., Antoku, S., Columbaro, M., Straatman, K.R., Worman, H.J., Gundersen, G.G., Lattanzi, G., Wehnert, M., et al. (2014). Muscular dystrophy-associated SUN1 and SUN2 variants disrupt nuclear-cytoskeletal connections and myonuclear organization. *PLoS Genet.* 10, e1004605.
- Méjat, A., and Misteli, T. (2010). LINC complexes in health and disease. *Nucl. Austin Tex* 1, 40–52.
- Méjat, A., Decostre, V., Li, J., Renou, L., Kesari, A., Hantaï, D., Stewart, C.L., Xiao, X., Hoffman, E., Bonne, G., et al. (2009). Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 184, 31–44.
- Mellad, J.A., Warren, D.T., and Shanahan, C.M. (2011). Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 47–54.
- Mendez, M.G., and Janmey, P.A. (2012). Transcription factor regulation by mechanical stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 728–732.
- Meraldi, P., Draviam, V.M., and Sorger, P.K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev. Cell* 7, 45–60.
- Meredith, J.E., Fazeli, B., and Schwartz, M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4, 953–961.

- Michalopoulos, G., and Pitot, H.C. (1975). Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp. Cell Res.* 94, 70–78.
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S., et al. (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J. Cell Biol.* 168, 141–153.
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Sasaki, H., Matsui, C., Akhmanova, A., Tsukita, S., and Vorobjev, I. (2006). Mammalian CLASPs are required for mitotic spindle organization and kinetochore alignment. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 11, 845–857.
- Minc, N., and Piel, M. (2012). Predicting division plane position and orientation. *Trends Cell Biol.* 22, 193–200.
- Minc, N., Burgess, D., and Chang, F. (2011). Influence of cell geometry on division-plane positioning. *Cell* 144, 414–426.
- Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 4, E83-90.
- Miroshnikova, Y.A., Nava, M.M., and Wickström, S.A. (2017). Emerging roles of mechanical forces in chromatin regulation. *J. Cell Sci.* 130, 2243–2250.
- Mishima, M., Pavicic, V., Grüneberg, U., Nigg, E.A., and Glotzer, M. (2004). Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature* 430, 908–913.
- Mislow, J.M.K., Holaska, J.M., Kim, M.S., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Wilson, K.L., and McNally, E.M. (2002). Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* 525, 135–140.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* 312, 232–237.
- Mitchison, T.J., Maddox, P., Gaetz, J., Groen, A., Shirasu, M., Desai, A., Salmon, E.D., and Kapoor, T.M. (2005). Roles of polymerization dynamics, opposed motors, and a tensile element in governing the length of *Xenopus* extract meiotic spindles. *Mol. Biol. Cell* 16, 3064–3076.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68.

- Mitrossilis, D., Fouchard, J., Guiroy, A., Desprat, N., Rodriguez, N., Fabry, B., and Asnacios, A. (2009). Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 18243–18248.
- Mitsushima, M., Toyoshima, F., and Nishida, E. (2009). Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2816–2827.
- Mitsushima, M., Aoki, K., Ebisuya, M., Matsumura, S., Yamamoto, T., Matsuda, M., Toyoshima, F., and Nishida, E. (2010). Revolving movement of a dynamic cluster of actin filaments during mitosis. *J. Cell Biol.* 191, 453–462.
- Molitor, T.P., and Traktman, P. (2014). Depletion of the protein kinase VRK1 disrupts nuclear envelope morphology and leads to BAF retention on mitotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell* 25, 891–903.
- Morimoto, A., Shibuya, H., Zhu, X., Kim, J., Ishiguro, K., Han, M., and Watanabe, Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J. Cell Biol.* 198, 165–172.
- Morin, X., and Bellaïche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev. Cell* 21, 102–119.
- Morris, E.J., Assi, K., Salh, B., and Dedhar, S. (2015). Integrin-linked kinase links dynactin-1/dynactin-2 with cortical integrin receptors to orient the mitotic spindle relative to the substratum. *Sci. Rep.* 5, 8389.
- Mosher, D.F., and Schad, P.E. (1979). Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *J. Clin. Invest.* 64, 781–787.
- Mott, J.D., and Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 558–564.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6181–6186.
- Murata-Hori, M., and Wang, Y.-L. (2002). Both midzone and astral microtubules are involved in the delivery of cytokinesis signals: insights from the mobility of aurora B. *J. Cell Biol.* 159, 45–53.
- Murawaki, Y., Kusakabe, Y., and Hirayama, C. (1991). Serum lysyl oxidase activity in chronic liver disease in comparison with serum levels of prolyl hydroxylase and laminin. *Hepatol. Baltim. Md* 14, 1167–1173.

- Murphy, S.P., Gumber, H.K., Mao, Y., and Bass, H.W. (2014). A dynamic meiotic SUN belt includes the zygotene-stage telomere bouquet and is disrupted in chromosome segregation mutants of maize (*Zea mays* L.). *Front. Plant Sci.* 5, 314.
- Murthy, K., and Wadsworth, P. (2005). Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 15, 724–731.
- Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol. CB* 25, R1002-1018.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393.
- Naba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2012). The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, M111.014647.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.
- Nain, A.S., and Cimini, D. (2013). MISP: The missing link between extracellular matrix and astral microtubules. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1821–1822.
- Nasrollahi, S., Walter, C., Loza, A.J., Schimizzi, G.V., Longmore, G.D., and Pathak, A. (2017). Past matrix stiffness primes epithelial cells and regulates their future collective migration through a mechanical memory. *Biomaterials* 146, 146–155.
- Nestor-Bergmann, A., Goddard, G., and Woolner, S. (2014). Force and the spindle: mechanical cues in mitotic spindle orientation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 34, 133–139.
- Neufeld, T.P., and Rubin, G.M. (1994). The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* 77, 371–379.
- Nicklas, R.B., Ward, S.C., and Gorbsky, G.J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J. Cell Biol.* 130, 929–939.
- Nie, S., Ke, H., Gao, F., Ren, J., Wang, M., Huo, L., Gong, W., and Feng, W. (2016). Coiled-Coil Domains of SUN Proteins as Intrinsic Dynamic Regulators. *Struct. Lond. Engl.* 1993 24, 80–91.

- Niiya, F., Tatsumoto, T., Lee, K.S., and Miki, T. (2006). Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene* 25, 827–837.
- Nishimura, Y., and Yonemura, S. (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J. Cell Sci.* 119, 104–114.
- Noatynska, A., Gotta, M., and Meraldi, P. (2012). Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence? *J. Cell Biol.* 199, 1025–1035.
- Noegel, A.A., and Neumann, S. (2011). The role of nesprins as multifunctional organizers in the nucleus and the cytoskeleton. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1725–1728.
- Novakova, L., Kovacovicova, K., Dang-Nguyen, T.Q., Sodek, M., Skultety, M., and Anger, M. (2016). A Balance between Nuclear and Cytoplasmic Volumes Controls Spindle Length. *PloS One* 11, e0149535.
- Oakes, P.W., Beckham, Y., Stricker, J., and Gardel, M.L. (2012). Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* 196, 363–374.
- Obino, D., Farina, F., Malbec, O., Sáez, P.J., Maurin, M., Gaillard, J., Dingli, F., Loew, D., Gautreau, A., Yuseff, M.-I., et al. (2016). Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. *Nat. Commun.* 7, 10969.
- O’Callaghan, C.J., and Williams, B. (2000). Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertens. Dallas Tex* 1979 36, 319–324.
- O’Connell, C.B., and Wang, Y.L. (2000). Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell* 11, 1765–1774.
- O’Connell, C.B., Loncarek, J., Hergert, P., Kourtidis, A., Conklin, D.S., and Khodjakov, A. (2008). The spindle assembly checkpoint is satisfied in the absence of interkinetochore tension during mitosis with unreplicated genomes. *J. Cell Biol.* 183, 29–36.
- O’Rourke, M.F., and Hashimoto, J. (2007). Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 1–13.

- O'Rourke, M.F., and Nichols, W.W. (2005). Aortic diameter, aortic stiffness, and wave reflection increase with age and isolated systolic hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 45, 652–658.
- Otey, C.A., Pavalko, F.M., and Burridge, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.* 111, 721–729.
- Ozlu, N., Monigatti, F., Renard, B.Y., Field, C.M., Steen, H., Mitchison, T.J., and Steen, J.J. (2010). Binding partner switching on microtubules and aurora-B in the mitosis to cytokinesis transition. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 336–350.
- Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I., and Korenbaum, E. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 295, 330–339.
- Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 118, 3419–3430.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221–233.
- Pan, M.-H., Wang, F., Lu, Y., Tang, F., Duan, X., Zhang, Y., Xiong, B., and Sun, S.-C. (2017). FHOD1 regulates cytoplasmic actin-based spindle migration for mouse oocyte asymmetric cell division. *J. Cell. Physiol.*
- Panetti, T.S. (2002). Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130CAS: effects on cell spreading and migration. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7, d143-150.
- Pankov, R., and Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861–3863.
- Parker, M.W., Rossi, D., Peterson, M., Smith, K., Sikström, K., White, E.S., Connett, J.E., Henke, C.A., Larsson, O., and Bitterman, P.B. (2014). Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J. Clin. Invest.* 124, 1622–1635.
- Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 116, 1409–1416.
- Pasapera, A.M., Schneider, I.C., Rericha, E., Schlaepfer, D.D., and Waterman, C.M. (2010). Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J. Cell Biol.* 188, 877–890.

- Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241–254.
- Patel, J.T., Bottrill, A., Prosser, S.L., Jayaraman, S., Straatman, K., Fry, A.M., and Shackleton, S. (2014). Mitotic phosphorylation of SUN1 loosens its connection with the nuclear lamina while the LINC complex remains intact. *Nucl. Austin Tex* 5, 462–473.
- Pawelczak, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 72–75.
- Pease, J.C., and Tirnauer, J.S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *J. Cell Sci.* 124, 1007–1016.
- Peippo, M., Gardberg, M., Lamminen, T., Kaipio, K., Carpen, O., and Heuser, V.D. (2017). FHOD1 formin is upregulated in melanomas and modifies proliferation and tumor growth. *Exp. Cell Res.* 350, 267–278.
- Pelham, R.J., and Wang, Y. I (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13661–13665.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C., and Nigg, E.A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591–602.
- Petridou, N.I., and Skourides, P.A. (2014). FAK transduces extracellular forces that orient the mitotic spindle and control tissue morphogenesis. *Nat. Commun.* 5, 5240.
- Petridou, N.I., and Skourides, P.A. (2016). A ligand-independent integrin $\beta 1$ mechanosensory complex guides spindle orientation. *Nat. Commun.* 7, 10899.
- Petrie, R.J., Koo, H., and Yamada, K.M. (2014). Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. *Science* 345, 1062–1065.
- Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., and Peters, J.-M. (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev. Cell* 12, 713–725.
- Peyton, S.R., and Putnam, A.J. (2005). Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell. Physiol.* 204, 198–209.

- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* 94, 1287–1312.
- Pickett-Heaps, J.D., Forer, A., and Spurck, T. (1997). Traction fibre: toward a “tensegral” model of the spindle. *Cell Motil. Cytoskeleton* 37, 1–6.
- Piekny, A.J., and Glotzer, M. (2008). Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 18, 30–36.
- Piekny, A.J., and Maddox, A.S. (2010). The myriad roles of Anillin during cytokinesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 881–891.
- di Pietro, F., Echard, A., and Morin, X. (2016). Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep.* 17, 1106–1130.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 427–438.
- Pinsky, B.A., and Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* 15, 486–493.
- Plessner, M., and Grosse, R. (2015). Extracellular signaling cues for nuclear actin polymerization. *Eur. J. Cell Biol.* 94, 359–362.
- Plessner, M., Melak, M., Chinchilla, P., Baarlink, C., and Grosse, R. (2015). Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *J. Biol. Chem.* 290, 11209–11216.
- Plotnikov, S.V., Pasapera, A.M., Sabass, B., and Waterman, C.M. (2012). Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell* 151, 1513–1527.
- Poh, Y.-C., Shevtsov, S.P., Chowdhury, F., Wu, D.C., Na, S., Dundr, M., and Wang, N. (2012). Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nat. Commun.* 3, 866.
- Pollard, T.D. (2017). Nine unanswered questions about cytokinesis. *J. Cell Biol.*
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208–1212.
- Polte, T.R., Eichler, G.S., Wang, N., and Ingber, D.E. (2004). Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C518-528.
- Ponticos, M., and Smith, B.D. (2014). Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J. Biomed. Res.* 28, 25–39.

- Postel, R., Ketema, M., Kuikman, I., de Pereda, J.M., and Sonnenberg, A. (2011). Nesprin-3 augments peripheral nuclear localization of intermediate filaments in zebrafish. *J. Cell Sci.* 124, 755–764.
- Poulet, A., Duc, C., Voisin, M., Desset, S., Tutois, S., Vanrobays, E., Benoit, M., Evans, D.E., Probst, A.V., and Tatout, C. (2017). The LINC complex contributes to heterochromatin organisation and transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 130, 590–601.
- Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat. Cell Biol.* 13, 1457–1465.
- Prosser, S.L., and Pelletier, L. (2017). Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 187–201.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612–615.
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., and López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4, 544–558.
- Puhka, M., Vihinen, H., Joensuu, M., and Jokitalo, E. (2007). Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 179, 895–909.
- Putney, L.K., and Barber, D.L. (2003). Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J. Biol. Chem.* 278, 44645–44649.
- Qi, R., Xu, N., Wang, G., Ren, H., Li, S., Lei, J., Lin, Q., Wang, L., Gu, X., Zhang, H., et al. (2015). The lamin-A/C-LAP2 α -BAF1 protein complex regulates mitotic spindle assembly and positioning. *J. Cell Sci.* 128, 2830–2841.
- Qin, X., Corriere, M.A., Matrisian, L.M., and Guzman, R.J. (2006). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1510–1516.

- Quesada-Hernández, E., Caneparo, L., Schneider, S., Winkler, S., Liebling, M., Fraser, S.E., and Heisenberg, C.-P. (2010). Stereotypical cell division orientation controls neural rod midline formation in zebrafish. *Curr. Biol.* **20**, 1966–1972.
- Quintyne, N.J., Reing, J.E., Hoffelder, D.R., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2005). Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* **307**, 127–129.
- Quyn, A.J., Appleton, P.L., Carey, F.A., Steele, R.J.C., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., and Näthke, I.S. (2010). Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell* **6**, 175–181.
- Raab, M., Swift, J., Dingal, P.C.D.P., Shah, P., Shin, J.-W., and Discher, D.E. (2012). Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *J. Cell Biol.* **199**, 669–683.
- Raharjo, W.H., Enarson, P., Sullivan, T., Stewart, C.L., and Burke, B. (2001). Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell Sci.* **114**, 4447–4457.
- Rajgor, D., and Shanahan, C.M. (2013). Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert Rev. Mol. Med.* **15**, e5.
- Ramanathan, S.P., Helenius, J., Stewart, M.P., Cattin, C.J., Hyman, A.A., and Muller, D.J. (2015). Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement. *Nat. Cell Biol.* **17**, 148–159.
- Ramkumar, N., and Baum, B. (2016). Coupling changes in cell shape to chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 511–521.
- Ran, J., Luo, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Chen, M., Liu, M., Li, D., and Zhou, J. (2017). Phosphorylation of EB1 regulates the recruitment of CLIP-170 and p150glued to the plus ends of astral microtubules. *Oncotarget* **8**, 9858–9867.
- Rankin, K.E., and Wordeman, L. (2010). Long astral microtubules uncouple mitotic spindles from the cytokinetic furrow. *J. Cell Biol.* **190**, 35–43.
- Redemann, S., Pecreaux, J., Goehring, N.W., Khairy, K., Stelzer, E.H.K., Hyman, A.A., and Howard, J. (2010). Membrane invaginations reveal cortical sites that pull on mitotic spindles in one-cell *C. elegans* embryos. *PloS One* **5**, e12301.

- Reichl, E.M., Ren, Y., Morpew, M.K., Delannoy, M., Effler, J.C., Girard, K.D., Divi, S., Iglesias, P.A., Kuo, S.C., and Robinson, D.N. (2008). Interactions between myosin and actin crosslinkers control cytokinesis contractility dynamics and mechanics. *Curr. Biol. CB* 18, 471–480.
- Reiser, K., McCormick, R.J., and Rucker, R.B. (1992). Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 2439–2449.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433–473.
- Reverte, C.G., Benware, A., Jones, C.W., and LaFlamme, S.E. (2006). Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 174, 491–497.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401–410.
- Rieder, C.L. (2005). Kinetochore fiber formation in animal somatic cells: dueling mechanisms come to a draw. *Chromosoma* 114, 310–318.
- Ringer, P., Colo, G., Fässler, R., and Grashoff, C. (2017). Sensing the mechanochemical properties of the extracellular matrix. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323, 638–641.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* 153, 1175–1186.

- Robertson, J., Jacquemet, G., Byron, A., Jones, M.C., Warwood, S., Selley, J.N., Knight, D., Humphries, J.D., and Humphries, M.J. (2015). Defining the phospho-adhesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling. *Nat. Commun.* 6, 6265.
- Robins, S.P. (2007). Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 849–852.
- Roca-Cusachs, P., del Rio, A., Puklin-Faucher, E., Gauthier, N.C., Biais, N., and Sheetz, M.P. (2013). Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by α -actinin triggers adhesion maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1361-1370.
- Romano, A., Guse, A., Krascenicova, I., Schnabel, H., Schnabel, R., and Glotzer, M. (2003). CSC-1: a subunit of the Aurora B kinase complex that binds to the survivin-like protein BIR-1 and the incenp-like protein ICP-1. *J. Cell Biol.* 161, 229–236.
- Rosa, A., Vlassaks, E., Pichaud, F., and Baum, B. (2015). Ect2/Pbl acts via Rho and polarity proteins to direct the assembly of an isotropic actomyosin cortex upon mitotic entry. *Dev. Cell* 32, 604–616.
- Rothballer, A., and Kutay, U. (2012). SnapShot: the nuclear envelope II. *Cell* 150, 1084–1084.e1.
- Rothballer, A., and Kutay, U. (2013). The diverse functional LINC of the nuclear envelope to the cytoskeleton and chromatin. *Chromosoma* 122, 415–429.
- Rothballer, A., Schwartz, T.U., and Kutay, U. (2013). LINCing complex functions at the nuclear envelope: what the molecular architecture of the LINC complex can reveal about its function. *Nucl. Austin Tex* 4, 29–36.
- Rottner, K., Hall, A., and Small, J.V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* CB 9, 640–648.
- Roubinet, C., Decelle, B., Chicanne, G., Dorn, J.F., Payrastre, B., Payre, F., and Carreno, S. (2011). Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J. Cell Biol.* 195, 99–112.
- Roubinet, C., Tran, P.T., and Piel, M. (2012). Common mechanisms regulating cell cortex properties during cell division and cell migration. *Cytoskelet.* Hoboken NJ 69, 957–972.

- Roux, K.J., Crisp, M.L., Liu, Q., Kim, D., Kozlov, S., Stewart, C.L., and Burke, B. (2009). Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2194–2199.
- Rubinstein, B., Larripa, K., Sommi, P., and Mogilner, A. (2009). The elasticity of motor-microtubule bundles and shape of the mitotic spindle. *Phys. Biol.* 6, 016005.
- Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4, 626–631.
- Saha, K., Keung, A.J., Irwin, E.F., Li, Y., Little, L., Schaffer, D.V., and Healy, K.E. (2008). Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys. J.* 95, 4426–4438.
- Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D.M., Schroer, T.A., Rattner, J.B., and Burke, B. (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* 108, 97–107.
- Samora, C.P., Mogessie, B., Conway, L., Ross, J.L., Straube, A., and McAinsh, A.D. (2011). MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis. *Nat. Cell Biol.* 13, 1040–1050.
- Sanger, J.W. (1975). Changing patterns of actin localization during cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1913–1916.
- Sanger, J.M., Reingold, A.M., and Sanger, J.W. (1984). Cell surface changes during mitosis and cytokinesis of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 237, 409–417.
- Sanger, J.M., Mittal, B., Dome, J.S., and Sanger, J.W. (1989). Analysis of cell division using fluorescently labeled actin and myosin in living PtK2 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 14, 201–219.
- Sansregret, L., and Swanton, C. (2017). The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7, a028373.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015–1026.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1680–1688.

- Schaller, T., Bulli, L., Pollpeter, D., Betancor, G., Kutzner, J., Apolonia, L., Herold, N., Burk, R., and Malim, M.H. (2017). Effects of Inner Nuclear Membrane Proteins SUN1/UNC-84A and SUN2/UNC-84B on the Early Steps of HIV-1 Infection. *J. Virol.* 91.
- Schiller, H.B., and Fässler, R. (2013). Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Rep.* 14, 509–519.
- Schiller, H.B., Hermann, M.-R., Polleux, J., Vignaud, T., Zanivan, S., Friedel, C.C., Sun, Z., Raducanu, A., Gottschalk, K.-E., Théry, M., et al. (2013). β 1- and α -class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* 15, 625–636.
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T., Yates, J.R., and Gerace, L. (2003). Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* 301, 1380–1382.
- Schmitt, J., Benavente, R., Hodzic, D., Höög, C., Stewart, C.L., and Alsheimer, M. (2007). Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7426–7431.
- Schnider, S.L., and Kohn, R.R. (1980). Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 66, 1179–1181.
- Scholey, J.M., Rogers, G.C., and Sharp, D.J. (2001). Mitosis, microtubules, and the matrix. *J. Cell Biol.* 154, 261–266.
- Schönichen, A., Mannherz, H.G., Behrmann, E., Mazur, A.J., Kühn, S., Silván, U., Schoenenberger, C.-A., Fackler, O.T., Raunser, S., Dehmelt, L., et al. (2013). FHOD1 is a combined actin filament capping and bundling factor that selectively associates with actin arcs and stress fibers. *J. Cell Sci.* 126, 1891–1901.
- Schulte, E., Schumacher, U., and Schünke, M. (2016). Atlas d'anatomie Prométhée: Anatomie générale et système locomoteur (De Boeck Supérieur).
- Schulze, N., Graessl, M., Blancke Soares, A., Geyer, M., Dehmelt, L., and Nalbant, P. (2014). FHOD1 regulates stress fiber organization by controlling the dynamics of transverse arcs and dorsal fibers. *J. Cell Sci.* 127, 1379–1393.
- Schwartz, C., Fischer, M., Mamchaoui, K., Bigot, A., Lok, T., Verdier, C., Duperray, A., Michel, R., Holt, I., Voit, T., et al. (2017). Lamins and nesprin-1 mediate inside-out mechanical coupling in muscle cell precursors through FHOD1. *Sci. Rep.* 7, 1253.

- Schweizer, N., Weiss, M., and Maiato, H. (2014). The dynamic spindle matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28, 1–7.
- Sedzinski, J., Biro, M., Oswald, A., Tinevez, J.-Y., Salbreux, G., and Paluch, E. (2011). Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature* 476, 462–466.
- Sehgel, N.L., Vatner, S.F., and Meininger, G.A. (2015). “Smooth Muscle Cell Stiffness Syndrome”-Revisiting the Structural Basis of Arterial Stiffness. *Front. Physiol.* 6, 335.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, e1002533.
- Severson, A.F., Baillie, D.L., and Bowerman, B. (2002). A Formin Homology protein and a profilin are required for cytokinesis and Arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *C. elegans*. *Curr. Biol. CB* 12, 2066–2075.
- Sewack, G.F., Ellis, T.W., and Hansen, U. (2001). Binding of TATA binding protein to a naturally positioned nucleosome is facilitated by histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1404–1415.
- Shahar, R., and Dean, M.N. (2013). The enigmas of bone without osteocytes. *BoneKEy Rep.* 2, 343.
- Shao, X., Tarnasky, H.A., Lee, J.P., Oko, R., and van der Hoorn, F.A. (1999). Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev. Biol.* 211, 109–123.
- Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41–47.
- Shemesh, T., Geiger, B., Bershadsky, A.D., and Kozlov, M.M. (2005). Focal adhesions as mechanosensors: a physical mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12383–12388.
- Shimada, N., Inouye, K., Sawai, S., and Kawata, T. (2010). SunB, a novel Sad1 and UNC-84 domain-containing protein required for development of Dictyostelium discoideum. *Dev. Growth Differ.* 52, 577–590.
- Silkworth, W.T., Nardj, I.K., Scholl, L.M., and Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PloS One* 4, e6564.

- Simionescu, A., Philips, K., and Vyavahare, N. (2005). Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 524–532.
- Sims, J.R., Karp, S., and Ingber, D.E. (1992). Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 4), 1215–1222.
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K.-T., and Musacchio, A. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a “safety belt” binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* 21, 2496–2506.
- Sivakumar, P., Gupta, S., Sarkar, S., and Sen, S. (2008). Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem.* 307, 159–167.
- Skibbens, R.V., Skeen, V.P., and Salmon, E.D. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism. *J. Cell Biol.* 122, 859–875.
- Skoufias, D.A., DeBonis, S., Saoudi, Y., Lebeau, L., Crevel, I., Cross, R., Wade, R.H., Hackney, D., and Kozielski, F. (2006). S-trityl-L-cysteine is a reversible, tight binding inhibitor of the human kinesin Eg5 that specifically blocks mitotic progression. *J. Biol. Chem.* 281, 17559–17569.
- Small, J.V., Rottner, K., Kaverina, I., and Anderson, K.I. (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim. Biophys. Acta* 1404, 271–281.
- Smith, G.C., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916–934.
- Smith, Q., Chan, X.Y., Carmo, A.M., Trempel, M., Saunders, M., and Gerecht, S. (2017). Compliant substratum guides endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Sci. Adv.* 3, e1602883.
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., and Janmey, P.A. (2007). Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys. J.* 93, 4453–4461.

- Sorce, B., Escobedo, C., Toyoda, Y., Stewart, M.P., Cattin, C.J., Newton, R., Banerjee, I., Stettler, A., Roska, B., Eaton, S., et al. (2015). Mitotic cells contract actomyosin cortex and generate pressure to round against or escape epithelial confinement. *Nat. Commun.* 6, 8872.
- Sosa, B.A., Rothballer, A., Kutay, U., and Schwartz, T.U. (2012). LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* 149, 1035–1047.
- Speer, M.Y., Yang, H.-Y., Brabb, T., Leaf, E., Look, A., Lin, W.-L., Frutkin, A., Dichek, D., and Giachelli, C.M. (2009). Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ. Res.* 104, 733–741.
- Stamenović, D. (2005). Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior. *Acta Biomater.* 1, 255–262.
- Stamenović, D., and Ingber, D.E. (2002). Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 1, 95–108.
- Starr, D.A. (2012). Laminopathies: too much SUN is a bad thing. *Curr. Biol. CB* 22, R678-680.
- Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H.A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473–484.
- Stevermann, L., and Liakopoulos, D. (2012). Molecular mechanisms in spindle positioning: structures and new concepts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 816–824.
- Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J., and Hyman, A.A. (2011a). Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 469, 226–230.
- Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J., and Hyman, A.A. (2011b). Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 469, 226–230.
- Stewart, R.M., Zubek, A.E., Rosowski, K.A., Schreiner, S.M., Horsley, V., and King, M.C. (2015). Nuclear-cytoskeletal linkages facilitate cross talk between the nucleus and intercellular adhesions. *J. Cell Biol.* 209, 403–418.
- Stewart-Hutchinson, P.J., Hale, C.M., Wirtz, D., and Hodzic, D. (2008). Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp. Cell Res.* 314, 1892–1905.

- Stick, R., Angres, B., Lehner, C.F., and Nigg, E.A. (1988). The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 107, 397–406.
- Su, K.-C., Takaki, T., and Petronczki, M. (2011). Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev. Cell* 21, 1104–1115.
- Su, X., Arellano-Santoyo, H., Portran, D., Gaillard, J., Vantard, M., Thery, M., and Pellman, D. (2013). Microtubule-sliding activity of a kinesin-8 promotes spindle assembly and spindle-length control. *Nat. Cell Biol.* 15, 948–957.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V., and Hershko, A. (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* 6, 185–197.
- Sun, Z., Guo, S.S., and Fässler, R. (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *J. Cell Biol.* 215, 445–456.
- Suzuki, K., and Takahashi, K. (2003). Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of beta1 integrin. *J. Cell. Physiol.* 197, 297–305.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.
- Svoboda, K., and Block, S.M. (1994). Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* 77, 773–784.
- Swaminathan, V., Fischer, R.S., and Waterman, C.M. (2016). The FAK-Arp2/3 interaction promotes leading edge advance and haptosensing by coupling nascent adhesions to lamellipodia actin. *Mol. Biol. Cell* 27, 1085–1100.
- Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajeroski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 341, 1240104.
- Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., Singh, R., Khanna, N., Belmont, A.S., and Wang, N. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat. Mater.* 15, 1287–1296.

- Takeya, R., Taniguchi, K., Narumiya, S., and Sumimoto, H. (2008). The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells. *EMBO J.* 27, 618–628.
- Tame, M.A., Raaijmakers, J.A., van den Broek, B., Lindqvist, A., Jalink, K., and Medema, R.H. (2014). Astral microtubules control redistribution of dynein at the cell cortex to facilitate spindle positioning. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 1162–1170.
- Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F., and Hynes, R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271–282.
- Taneja, N., Fenix, A.M., Rathbun, L., Millis, B.A., Tyska, M.J., Hehnly, H., and Burnette, D.T. (2016). Focal adhesions control cleavage furrow shape and spindle tilt during mitosis. *Sci. Rep.* 6, 29846.
- Tanzer, M.L. (1973). Cross-linking of collagen. *Science* 180, 561–566.
- Taranum, S., Sur, I., Müller, R., Lu, W., Rashmi, R.N., Munck, M., Neumann, S., Karakesisoglou, I., and Noegel, A.A. (2012a). Cytoskeletal interactions at the nuclear envelope mediated by nesprins. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 736524.
- Taranum, S., Vaylann, E., Meinke, P., Abraham, S., Yang, L., Neumann, S., Karakesisoglou, I., Wehnert, M., and Noegel, A.A. (2012b). LINC complex alterations in DMD and EDMD/CMT fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 614–628.
- Tarnasky, H., Gill, D., Murthy, S., Shao, X., Demetrick, D.J., and van der Hoorn, F.A. (1998). A novel testis-specific gene, SPAG4, whose product interacts specifically with outer dense fiber protein ODF27, maps to human chromosome 20q11.2. *Cytogenet. Cell Genet.* 81, 65–67.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I., and Miki, T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 147, 921–928.
- Tawil, N., Wilson, P., and Carbonetto, S. (1993). Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs. focal contacts. *J. Cell Biol.* 120, 261–271.
- Taylor, A.C., and Robbins, E. (1963). Observations on microextensions from the surface of isolated vertebrate cells. *Dev. Biol.* 6, 660–673.

- Taylor, M.P., Koyuncu, O.O., and Enquist, L.W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 427–439.
- Tee, S.-Y., Fu, J., Chen, C.S., and Janmey, P.A. (2011). Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness. *Biophys. J.* 100, L25-27.
- Tesauro, M., Mauriello, A., Rovella, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Cardillo, C., Melino, G., and Di Daniele, N. (2017). Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. *J. Intern. Med.* 281, 471–482.
- Thakar, K., May, C.K., Rogers, A., and Carroll, C.W. (2017). Opposing roles for distinct LINC complexes in regulation of the small GTPase RhoA. *Mol. Biol. Cell* 28, 182–191.
- Theriot, J.A., and Mitchison, T.J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 126–131.
- Théry, M., and Bornens, M. (2006). Cell shape and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 648–657.
- Théry, M., Racine, V., Pépin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* 7, 947–953.
- Théry, M., Jiménez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., and Jülicher, F. (2007). Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447, 493–496.
- Thompson, D.W. (1917). *On growth and form* (Cambridge [Eng.] University press).
- Thompson, L.J., and Fields, A.P. (1996). cyclin protein kinase C is required for the G2/M phase transition of cell cycle. *J. Biol. Chem.* 271, 15045–15053.
- Tinevez, J.-Y., Schulze, U., Salbreux, G., Roensch, J., Joanny, J.-F., and Paluch, E. (2009). Role of cortical tension in bleb growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18581–18586.
- Tolić, I.M. (2017). Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. *Eur. Biophys. J. EBJ.*
- Tomita, K., and Cooper, J.P. (2006). The meiotic chromosomal bouquet: SUN collects flowers. *Cell* 125, 19–21.
- Totaro, A., Castellan, M., Battilana, G., Zanconato, F., Azzolin, L., Giulitti, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2017). YAP/TAZ link cell mechanics to Notch signalling to control epidermal stem cell fate. *Nat. Commun.* 8, 15206.

- Tournier, S., Gachet, Y., Buck, V., Hyams, J.S., and Millar, J.B.A. (2004). Disruption of astral microtubule contact with the cell cortex activates a Bub1, Bub3, and Mad3-dependent checkpoint in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 15, 3345–3356.
- Toyama, B.H., Savas, J.N., Park, S.K., Harris, M.S., Ingolia, N.T., Yates, J.R., and Hetzer, M.W. (2013). Identification of Long-Lived Proteins Reveals Exceptional Stability of Essential Cellular Structures. *Cell* 154, 971–982.
- Toyoshima, F., and Nishida, E. (2007). Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J.* 26, 1487–1498.
- Toyoshima, F., Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., and Nishida, E. (2007). PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells. *Dev. Cell* 13, 796–811.
- Trichet, L., Le Digabel, J., Hawkins, R.J., Vedula, S.R.K., Gupta, M., Ribault, C., Hersen, P., Voituriez, R., and Ladoux, B. (2012). Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6933–6938.
- Tsai, M.-Y., Wang, S., Heidinger, J.M., Shumaker, D.K., Adam, S.A., Goldman, R.D., and Zheng, Y. (2006). A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* 311, 1887–1893.
- Tse, H.T.K., Weaver, W.M., and Di Carlo, D. (2012). Increased asymmetric and multi-daughter cell division in mechanically confined microenvironments. *PloS One* 7, e38986.
- Tseng, L.-C., and Chen, R.-H. (2011). Temporal control of nuclear envelope assembly by phosphorylation of lamin B receptor. *Mol. Biol. Cell* 22, 3306–3317.
- Turgay, Y., Ungricht, R., Rothballer, A., Kiss, A., Csucs, G., Horvath, P., and Kutay, U. (2010). A classical NLS and the SUN domain contribute to the targeting of SUN2 to the inner nuclear membrane. *EMBO J.* 29, 2262–2275.
- Turgay, Y., Champion, L., Balazs, C., Held, M., Toso, A., Gerlich, D.W., Meraldi, P., and Kutay, U. (2014). SUN proteins facilitate the removal of membranes from chromatin during nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* 204, 1099–1109.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2, E231–236.
- Turner, C.E., Glenney, J.R., and Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* 111, 1059–1068.

- Uchida, K.S.K., Takagaki, K., Kumada, K., Hirayama, Y., Noda, T., and Hirota, T. (2009). Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 184, 383–390.
- Uehara, R., Goshima, G., Mabuchi, I., Vale, R.D., Spudich, J.A., and Griffiths, E.R. (2010). Determinants of myosin II cortical localization during cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 20, 1080–1085.
- Uhlmann, F. (2003). Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. *Curr. Biol. CB* 13, R104-114.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37–42.
- Ungricht, R., Klann, M., Horvath, P., and Kutay, U. (2015). Diffusion and retention are major determinants of protein targeting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* 209, 687–703.
- Uyeda, T.Q.P., Iwadate, Y., Umeki, N., Nagasaki, A., and Yumura, S. (2011). Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain. *PloS One* 6, e26200.
- Varga, V., Leduc, C., Bormuth, V., Diez, S., and Howard, J. (2009). Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell* 138, 1174–1183.
- van Varik, B.J., Rennenberg, R.J.M.W., Reutelingsperger, C.P., Kroon, A.A., de Leeuw, P.W., and Schurgers, L.J. (2012). Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front. Genet.* 3, 290.
- Vaughan, A., Alvarez-Reyes, M., Bridger, J.M., Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Wehnert, M., Morris, G.E., Whitfield WGF, null, and Hutchison, C.J. (2001). Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 114, 2577–2590.
- Versaavel, M., Braquenier, J.-B., Riaz, M., Grevesse, T., Lantoine, J., and Gabriele, S. (2014). Super-resolution microscopy reveals LINC complex recruitment at nuclear indentation sites. *Sci. Rep.* 4, 7362.
- Verzija, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., Baynes, J.W., and TeKoppele, J.M. (2000). Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 275, 39027–39031.

- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299–1304.
- Wade, R.H., and Hyman, A.A. (1997). Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 12–17.
- Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2009). Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol. Rev.* 89, 957–989.
- Wagenseil, J.E., Ciliberto, C.H., Knutsen, R.H., Levy, M.A., Kovacs, A., and Mecham, R.P. (2010). The importance of elastin to aortic development in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, H257-264.
- Walcott, S., Kim, D.-H., Wirtz, D., and Sun, S.X. (2011). Nucleation and decay initiation are the stiffness-sensitive phases of focal adhesion maturation. *Biophys. J.* 101, 2919–2928.
- Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C1345-1350.
- Wang, H.B., Dembo, M., Hanks, S.K., and Wang, Y. (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11295–11300.
- Wang, J.-Y., Yu, I.-S., Huang, C.-C., Chen, C.-Y., Wang, W.-P., Lin, S.-W., Jeang, K.-T., and Chi, Y.-H. (2015). Sun1 deficiency leads to cerebellar ataxia in mice. *Dis. Model. Mech.* 8, 957–967.
- Wang, M., Monticone, R.E., and Lakatta, E.G. (2010). Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19, 201–207.
- Wang, N., Butler, J.P., and Ingber, D.E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124–1127.
- Wang, Q., Du, X., Cai, Z., and Greene, M.I. (2006). Characterization of the structures involved in localization of the SUN proteins to the nuclear envelope and the centrosome. *DNA Cell Biol.* 25, 554–562.
- Wang, W., Shi, Z., Jiao, S., Chen, C., Wang, H., Liu, G., Wang, Q., Zhao, Y., Greene, M.I., and Zhou, Z. (2012). Structural insights into SUN-KASH complexes across the nuclear envelope. *Cell Res.* 22, 1440–1452.

- Wang, Y., El-Zaru, M.R., Surks, H.K., and Mendelsohn, M.E. (2004). Formin Homology Domain Protein (FHOD1) Is a Cyclic GMP-dependent Protein Kinase I-binding Protein and Substrate in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 24420–24426.
- Wang, Y.L., Silverman, J.D., and Cao, L.G. (1994). Single particle tracking of surface receptor movement during cell division. *J. Cell Biol.* 127, 963–971.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16, 3044–3056.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136–143.
- Watanabe, S., Ando, Y., Yasuda, S., Hosoya, H., Watanabe, N., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2008). mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 2328–2338.
- Waters, J.C., Chen, R.H., Murray, A.W., and Salmon, E.D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J. Cell Biol.* 141, 1181–1191.
- Watson, K.E., Boström, K., Ravindranath, R., Lam, T., Norton, B., and Demer, L.L. (1994). TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J. Clin. Invest.* 93, 2106–2113.
- Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4, E97-100.
- Wells, R.G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatol. Baltim. Md* 47, 1394–1400.
- Wells, W.A. (2001). Searching for a spindle matrix. *J. Cell Biol.* 154, 1102–1104.
- Werner, M., Munro, E., and Glotzer, M. (2007). Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis. *Curr. Biol. CB* 17, 1286–1297.

- Werth, D., Grassi, G., Konjer, N., Dapas, B., Farra, R., Giansante, C., Kandolf, R., Guarnieri, G., Nordheim, A., and Heidenreich, O. (2010). Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 216–224.
- Weterings, E., and Chen, D.J. (2007). DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys? *J. Cell Biol.* 179, 183–186.
- Wheeler, M.A., Davies, J.D., Zhang, Q., Emerson, L.J., Hunt, J., Shanahan, C.M., and Ellis, J.A. (2007). Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp. Cell Res.* 313, 2845–2857.
- White, E.A., and Glotzer, M. (2012). Centralspindlin: at the heart of cytokinesis. *Cytoskelet. Hoboken NJ* 69, 882–892.
- Wiberg, C., Klatt, A.R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J.F., Heinegård, D., and Mörgelin, M. (2003). Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J. Biol. Chem.* 278, 37698–37704.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S.H.M., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K., and Sonnenberg, A. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell Biol.* 171, 799–810.
- Winograd-Katz, S.E., Fässler, R., Geiger, B., and Legate, K.R. (2014). The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 273–288.
- Wolf, K., and Friedl, P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol.* 21, 736–744.
- Wolfenson, H., Bershadsky, A., Henis, Y.I., and Geiger, B. (2011). Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J. Cell Sci.* 124, 1425–1432.
- Wolff, J. (2010). The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870. *Clin. Orthop.* 468, 1056–1065.
- Woolner, S., and Papalopulu, N. (2012). Spindle position in symmetric cell divisions during epiboly is controlled by opposing and dynamic apicobasal forces. *Dev. Cell* 22, 775–787.

- Woolner, S., O'Brien, L.L., Wiese, C., and Bement, W.M. (2008). Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 182, 77–88.
- Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2006). Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link. *Trends Cell Biol.* 16, 67–69.
- Wu, Z., Plotnikov, S.V., Moalim, A.Y., Waterman, C.M., and Liu, J. (2017). Two Distinct Actin Networks Mediate Traction Oscillations to Confer Focal Adhesion Mechanosensing. *Biophys. J.* 112, 780–794.
- Wühr, M., Chen, Y., Dumont, S., Groen, A.C., Needleman, D.J., Salic, A., and Mitchison, T.J. (2008). Evidence for an upper limit to mitotic spindle length. *Curr. Biol. CB* 18, 1256–1261.
- Xiong, H., Rivero, F., Euteneuer, U., Mondal, S., Mana-Capelli, S., Larochelle, D., Vogel, A., Gassen, B., and Noegel, A.A. (2008). Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability. *Traffic Cph. Den.* 9, 708–724.
- Yamakita, Y., Totsukawa, G., Yamashiro, S., Fry, D., Zhang, X., Hanks, S.K., and Matsumura, F. (1999). Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *J. Cell Biol.* 144, 315–324.
- Yamashita, H., Ichikawa, T., Matsuyama, D., Kimura, Y., Ueda, K., Craig, S.W., Harada, I., and Kioka, N. (2014). The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin α in sensing the stiffness of the extracellular matrix. *J. Cell Sci.* 127, 1875–1886.
- Yang, C., Tibbitt, M.W., Basta, L., and Anseth, K.S. (2014). Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nat. Mater.* 13, 645–652.
- Yang, L., Guan, T., and Gerace, L. (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J. Cell Biol.* 137, 1199–1210.
- Yao, M., Goult, B.T., Chen, H., Cong, P., Sheetz, M.P., and Yan, J. (2014). Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci. Rep.* 4, 4610.

- Yasmin, null, McEniery, C.M., Wallace, S., Dakham, Z., Pulsalkar, P., Pusalkar, P., Maki-Petaja, K., Ashby, M.J., Cockcroft, J.R., and Wilkinson, I.B. (2005). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 372.
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., and Janmey, P.A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* 60, 24–34.
- Young, D.A., Choi, Y.S., Engler, A.J., and Christman, K.L. (2013). Stimulation of adipogenesis of adult adipose-derived stem cells using substrates that mimic the stiffness of adipose tissue. *Biomaterials* 34, 8581–8588.
- Young, J.L., Kretchmer, K., Ondeck, M.G., Zambon, A.C., and Engler, A.J. (2014). Mechanosensitive kinases regulate stiffness-induced cardiomyocyte maturation. *Sci. Rep.* 4, 6425.
- Yu, J., Lei, K., Zhou, M., Craft, C.M., Xu, G., Xu, T., Zhuang, Y., Xu, R., and Han, M. (2011). KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1061–1073.
- Yüce, O., Piekny, A., and Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J. Cell Biol.* 170, 571–582.
- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* 9, 858–867.
- Zhang, Q., Skepper, J.N., Yang, F., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A., and Shanahan, C.M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* 114, 4485–4498.
- Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A., and Shanahan, C.M. (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 118, 673–687.

- Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N.F., Davies, J.D., Wasner, C., Feuer, A., Ragnauth, C.D., Yi, Q., Mellad, J.A., Warren, D.T., et al. (2007). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2816–2833.
- Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R., and Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron* 64, 173–187.
- Zhen, Y.-Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A., and Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 115, 3207–3222.
- Zheng, Y. (2010). A membranous spindle matrix orchestrates cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 529–535.
- Zheng, Z., Wan, Q., Liu, J., Zhu, H., Chu, X., and Du, Q. (2013). Evidence for dynein and astral microtubule-mediated cortical release and transport of Gai/LGN/NuMA complex in mitotic cells. *Mol. Biol. Cell* 24, 901–913.
- Zhou, M., and Wang, Y.-L. (2008). Distinct pathways for the early recruitment of myosin II and actin to the cytokinetic furrow. *Mol. Biol. Cell* 19, 318–326.
- Zhou, Z., Du, X., Cai, Z., Song, X., Zhang, H., Mizuno, T., Suzuki, E., Yee, M.R., Berezov, A., Murali, R., et al. (2012). Structure of Sad1-UNC84 homology (SUN) domain defines features of molecular bridge in nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* 287, 5317–5326.
- Zhu, M., Settele, F., Kotak, S., Sanchez-Pulido, L., Ehret, L., Ponting, C.P., Gönczy, P., and Hoffmann, I. (2013). MISP is a novel Plk1 substrate required for proper spindle orientation and mitotic progression. *J. Cell Biol.* 200, 773–787.
- Zhu, R., Antoku, S., and Gundersen, G.G. (2017). Centrifugal Displacement of Nuclei Reveals Multiple LINC Complex Mechanisms for Homeostatic Nuclear Positioning. *Curr. Biol.* 0.
- Zieman, S.J., Melenovsky, V., and Kass, D.A. (2005). Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 932–943.
- Zlotek-Zlotkiewicz, E., Monnier, S., Cappello, G., Le Berre, M., and Piel, M. (2015). Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis. *J. Cell Biol.* 211, 765–774.

Thèse de Doctorat

Nejma BELAADI

Régulation de la mitose par la rigidité de la matrice extracellulaire : étude du rôle de la protéine SUN2

Mitosis regulation by extracellular matrix rigidity: involvement of SUN2

Résumé

Au sein des tissus, les cellules sont entourées par une matrice extracellulaire (MEC) dont les propriétés mécaniques influencent de nombreux aspects du comportement cellulaire, tels que la migration ou la différenciation. L'objectif de ce travail était d'explorer les effets de la rigidité de la MEC sur la mitose. En utilisant des hydrogels de polyacrylamide, nous avons observé que des cellules murines et humaines cultivées sur des matrices de rigidités croissantes se divisent plus rapidement. Grâce à une analyse protéomique, nous avons mis en évidence que SUN2, une protéine de l'enveloppe nucléaire participe à la régulation de la progression mitotique en réponse à la rigidité de la MEC. Sur une matrice rigide, la stabilité et l'expression de SUN2 augmentent, favorisant ainsi le recrutement de l'actine au niveau cortical lors de la mitose et la progression de la métaphase. L'ensemble de ces résultats révèle l'existence d'un nouveau mécanisme régulant la division cellulaire en fonction de la rigidité de la MEC. Ce mécanisme pourrait notamment jouer un rôle important dans de nombreux contextes physiologiques et pathologiques associés à une rigidification de la MEC tels que le vieillissement ou l'hypertension artérielle.

Mots clés

SUN2 - mitose - actine corticale - cytosquelette - matrice extracellulaire - lamina - mécanotransduction

Abstract

Within tissues, cells are surrounded by an extracellular matrix (ECM), whose mechanical properties regulate many aspects of cell behavior, including motility and differentiation. Here we examined the effect of ECM rigidity on cell division. We found that cells divide more rapidly when cultured on substrates with increasing stiffness. We next compared the proteomic content of cells dividing on soft and stiff substrates and we found that ECM rigidity regulates the stability of the LINC complex component SUN2, whose level of expression affects mitotic progression. On rigid substrates, high level of SUN2 promotes cortical actin recruitment, force generation and mitotic progression, while low level of SUN2 delays the onset of anaphase when cells are grown on soft ECM. These results revealed a new mechanism that regulates mitotic progression in response to changes in ECM rigidity.

Key Words

SUN2 - mitosis - cortical actin - cytoskeleton - extracellular matrix - lamina - mechanotransduction