

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

THESE

Présentée par

Charlotte CLAEYSSEN

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité « Physiologie »

**La O-GlcNAcylation et son interaction avec la
phosphorylation : quel impact sur la cytoarchitecture
et la fonction du muscle squelettique ?**

Soutenue publiquement le 11 octobre 2022 devant le jury composé de :

Mme Sabrina BATONNET-PICHON Maitresse de conférence, Université Paris Diderot, CNRS UMR8251, Paris	Rapporteur
M. Tarik ISSAD DR CNRS, INSERM U1016, Institut Cochin, Paris	Rapporteur
Mme Capucine TROLLET DR, UMRS974, Institut de Myologie, Paris	Examinatrice
M. Onnik AGBULUT Professeur, Sorbonne Université, UMR8256, Paris	Examineur
M. Benjamin LAUZIER Professeur, Université de Nantes, Inserm UMR1087/CNRS UMR6291, Nantes	Examineur
M. Tony LEFEBVRE Professeur, Université de Lille, UMR8576, Lille	Examineur
Mme Caroline CIENIEWSKI-BERNARD Maitresse de conférence, Université de Lille, ULR7369, Lille	Directrice

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

THESE

Présentée par

Charlotte CLAEYSSEN

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
Spécialité « Physiologie »

**La O-GlcNAcylation et son interaction avec la
phosphorylation : quel impact sur la cytoarchitecture
et la fonction du muscle squelettique ?**

Soutenue publiquement le 11 octobre 2022 devant le jury composé de :

Mme Sabrina BATONNET-PICHON Maitresse de conférence, Université Paris Diderot, CNRS UMR8251, Paris	Rapporteur
M. Tarik ISSAD DR CNRS, INSERM U1016, Institut Cochin, Paris	Rapporteur
Mme Capucine TROLLET DR, UMRS974, Institut de Myologie, Paris	Examinatrice
M. Onnik AGBULUT Professeur, Sorbonne Université, UMR8256, Paris	Examineur
M. Benjamin LAUZIER Professeur, Université de Nantes, Inserm UMR1087/CNRS UMR6291, Nantes	Examineur
M. Tony LEFEBVRE Professeur, Université de Lille, UMR8576, Lille	Examineur
Mme Caroline CIENIEWSKI-BERNARD Maitresse de conférence, Université de Lille, ULR7369, Lille	Directrice

*« La science est une chose merveilleuse...
tant qu'il ne faut pas en vivre »*

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur **Capucine Trollet** et les professeurs **Benjamin Lauzier**, **Onnik Agbulut** et **Tony Lefebvre** de faire partie de mon jury et d'avoir pris de votre temps pour examiner ce manuscrit et particulièrement les docteurs **Sabrina Bâtonnet-Pichon** et **Tarik Issad** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le professeur **Serge Berthoin**, directeur de l'Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société (URePSSS) qui m'a accueilli au sein de son unité pour réaliser mes différents stages et cette thèse. Serge je te remercie de la confiance que tu m'accordes au quotidien et dans les tâches administratives qui me sont confiées (même si l'année prochaine je passe le flambeau aux petits jeunes pour faire partie des comités et pour l'organisation des journées portes ouvertes). Jusqu'à mon départ je ferai en sorte de maintenir l'esprit « corporate » de l'équipe que tu apprécies.

J'adresse de très sincères remerciements à ma directrice de thèse le docteur **Caroline Cieniewski-Bernard** sans qui cette thèse n'aurait pu avoir lieu. Caro tu m'as accueillie lors de mon stage de master 1 et je n'ai plus jamais quitté l'équipe. Tu m'as encadrée, soutenue dans les bons comme les mauvais moments (l'ascenseur émotionnel du grand jury) et poussée à me dépasser pour en arriver jusque-là. Je te remercie également pour toutes les connaissances scientifiques et les compétences techniques que j'ai pu acquérir grâce à toi durant toutes ces années, qui m'ont permis de mener à bien ces travaux de thèse et qui me serviront, j'en suis sûre dans le futur. Je tenais également à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée que ce soit pour les expériences ou l'encadrement des stagiaires (et ils ont été nombreux). Enfin, je sais que ces derniers mois ont été stressants pour toi qui n'aimes pas faire les choses à la dernière minute, alors je te remercie pour ta gentillesse, ta disponibilité et pour avoir été présente jusqu'au bout pour m'aider à réaliser ce manuscrit.

Encore une fois, un grand merci aux professeurs **Benjamin Lauzier** et **Onnik Agbulut** d'avoir répondu présents pour me suivre tout au long de ma thèse lors des comités de suivi individuel et pour votre disponibilité à répondre à mes questions.

Je remercie chaleureusement **l'AFM-Téléthon** pour la confiance accordée en finançant mes travaux et sans qui je n'aurais pas pu réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier **Elodie Richard** qui a été d'une aide précieuse pour les heures passées au microscope confocal afin d'obtenir de belles images et au docteur **Barbara Deracinois** pour son accueil au sein de la plateforme de spectrométrie de masse et son aide sur certains protocoles. Mais aussi à l'ensemble des enseignants et du personnel des établissements dans lesquels j'ai réalisé mes interventions dans le cadre de l'opération « 1000 chercheurs dans les écoles ».

Merci à **l'ensemble des collègues de l'URePSSS** que j'ai pu côtoyer lors de ces années au laboratoire et qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux tout en faisant régner une bonne atmosphère de travail.

Je tiens particulièrement à remercier l'ensemble des collègues du thème (les « ex Lille 1 »). Le professeur **Bruno Bastide** qui m'a permis de finaliser cette thèse dans les meilleures conditions puisqu'il est en partie responsable de l'obtention du poste d'ATER auquel j'ai postulé pour cette quatrième et dernière année de thèse. Merci Bruno de m'avoir également aidée et formée pour les manipulations à l'animalerie. Le professeur **Marie-Hélène Canu** et le docteur **Erwan Dupont** pour leur gentillesse et leur disponibilité en particulier lors de cette dernière année de thèse/ATER. Mais également les techniciennes **Laetitia**, **Julie** sans oublier **Valérie**, avec qui j'ai eu plaisir à travailler à

l'animalerie. Je remercie **Annie** pour sa gentillesse et sa disponibilité afin que nos manip puissent toujours se dérouler dans les meilleures conditions.

J'adresse également mes remerciements à la team du rez-de-chaussée, **Justine** et **Julien**, toujours disponibles, réactifs et efficaces pour les petits soucis administratifs, mais également **Virginie**, **Kelly**, **Sylvain** et **Adrien** qui a réussi à me faire courir un lendemain de soirée et qui m'a fait monter sur une moto pour la première fois.

Merci au professeur **Elsa Heyman** pour ta gentillesse et pour m'avoir fait découvrir l'escalade (malgré mon vertige), aux docteurs **Pierre Morel**, **Clément Llana**, **Yann Savina** pour votre bonne humeur et les bières qu'on a partagées ensemble. Un grand merci à tous les doctorants devenus docteurs avec qui j'ai partagé ces années **Agathe**, **Baptiste** et **Mehdi**. Mais également à **Julie** pour ta disponibilité à répondre à mes questions même depuis ton départ en post-doc à Munich, à **Samir** avec qui j'ai partagé de très nombreuses heures au laboratoire et en salle de culture et à **Elodie** pour ta bonne humeur. Sans oublier **Sarah** qui est devenue plus qu'une simple collègue, avec qui j'ai passé une bonne partie de ma thèse malgré ses allers retours au Canada, qui m'a hébergée à de nombreuses reprises après les soirées trop arrosées sur Lille et avec qui j'ai et j'espère encore partager de bons moments lors de sa future vie Dunkerquoise (j'attends l'invitation pour une future pool party avec impatience).

Je tiens à remercier les doctorants actuels, mes collègues de bureau avec qui j'ai partagé le plus clair de mon temps durant cette thèse et qui ont contribué à la bonne ambiance, **Islem**, **Joseph**, **Léa**, sans oublier **Cassandra** qui elle aussi m'a hébergée plusieurs fois après les soirées lilloises et avec qui j'ai eu la chance de passer un super week-end en toute sobriété à Budapest, mais également **Orlane** qui me supporte (malgré elle) depuis plusieurs années et qui est toujours là pour les bons plans shopping et les conseils mode. Et enfin **Nathan**, membre de notre petite team « glyco », je te remercie de me supporter au labo et dans le bureau depuis le moment où j'ai commencé à te former jusqu'à maintenant, merci également de m'avoir aidée pendant mes journées de manip en « quantité industrielle » ou quand je restais bosser à Dunkerque, enfin, merci de m'avoir assurée le petit déjeuner en congrès à Hanovre (la nourriture c'est sacré), d'avoir partagé des séances de sport d'une grande qualité et d'avoir grandement participé à la bonne humeur dans le bureau ces derniers temps (Alors... Tu préfères ?).

J'adresse des remerciements tout particuliers aux « petits jeunots », les stagiaires de master 2 de cette année et, pour la plupart futurs doctorants de choc, **Angéline**, **Antoine**, **Axel**, **Capucine**, **Lucille**, **Khamis**, **Maxime**, **Mélanie** pour votre bonne humeur, pour les petits déjeuners et les goûters improvisés (mon summer body ne vous remercie pas lui) et pour les bons moments qu'on a partagés dans et en dehors du labo. Vous avez tous largement contribué au fait que cette dernière année de thèse fut agréable malgré la pression (et on préfère la boire, vous savez de quoi je parle). Je vous souhaite à tous de réussir ce que vous allez entreprendre et j'espère que vous n'allez pas trop vous battre pour récupérer mon bureau (n'est-ce pas Capucine ?) et qu'on restera tous en contact pour de futurs apéros (Maxime tu auras une réputation à tenir en tant que nouveau dunkerquois) !

Je remercie tous les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer pendant toutes ces années, **Amir**, **Antoine**, **Baptiste**, **Clémentine**, **Dylan**, **Emma**, **Inès**, **Jérémy**, **Kamel**, **Maëlle**, **Marylou**, **Nina**, **Quentin**, **Romain** et **Sarah** j'espère vous avoir apporté autant que ce que vous m'avez apporté. Mais également tous les étudiants que j'ai eu l'opportunité de croiser au laboratoire ou dans le bureau et avec qui j'ai partagé de bons moments **Alexandre**, **Aliénor**, **Benoit**, **Corentin**, **Cristina**, **Julien**, **Lucile**, **Manon**. Je remercie également **Marie** et **Noémie**, mes amies de promo avec qui j'ai fait mes tous débuts à Euraspport pendant notre stage de master 1.

Je remercie **mes amis**, toujours présents dans les bons comme les mauvais moments et grâce à qui je me sens si bien entourée. Comme je le dis toujours, les amis, c'est la famille que l'on choisit et je suis pressée de fêter cette fin de thèse avec vous comme il se doit.

Enfin, je remercie du fond du cœur **mes parents** qui ont grandement contribué à ma réussite jusqu'ici, j'ai de la chance qu'ils m'aient toujours aidé et soutenu. Les mots ne sont pas assez forts pour remercier tout particulièrement **ma petite maman** sur qui j'ai toujours pu compter. J'espère qu'avec ce manuscrit tu comprendras enfin ce que j'ai bien pu faire de mes journées au laboratoire pendant la thèse et depuis le master 1.

RESUME

L'organisation stricte et régulière des myofibrilles du muscle strié squelettique résulte d'une structure moléculaire semi-cristalline regroupant les protéines contractiles (motrices et régulatrices) et structurales. Cette organisation sarcomérique est essentielle pour assurer la génération et la transmission d'une force. En plus des protéines contractiles, la structure et la fonction du muscle squelettique dépendent également d'un assemblage macromoléculaire complexe de protéines structurales appelé « cytosquelette sarcomérique » ; celui-ci permet la localisation précise et régulière des protéines contractiles et donc un développement efficace de la force. Loin d'être une organisation statique, le cytosquelette est au contraire une structure très dynamique impliquant des interactions protéines-protéines finement régulées. La régulation de ces interactions protéiques implique des modifications post-traductionnelles (MPTs), la plus connue étant la phosphorylation.

Toutefois, il existe une autre modification post-traductionnelle, la O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique intervenant entre autres sur les protéines du muscle squelettique. Cette MPT pourrait être essentielle à l'organisation sarcomérique. En effet, des données préliminaires du laboratoire ont montré qu'un changement de la O-GlcNAcylation dans des myotubes est étroitement associé à la réorganisation sarcomérique, corrélée à des changements de la O-GlcNAcylation des protéines myofibrillaires. De manière intéressante, la modulation de l'interaction entre la desmine, une protéine majeure des filaments intermédiaires, et son chaperon moléculaire, la petite protéine de choc thermique α B-cristalline, semble être impliquée dans ces changements morphométriques du sarcomère. Cependant, ni le rôle précis de la O-GlcNAcylation sur la desmine et l' α B-cristalline, ni son interaction avec d'autres MPTs ne sont connus.

Ainsi, l'objectif principal de ma thèse était **la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation sur les propriétés de la desmine dans des cellules musculaires squelettiques**. Pour cela, nous avons utilisé des composés pharmacologiques conduisant à des changements du taux global de la O-GlcNAcylation dans des myoblastes différenciés en myotubes. Nous avons ensuite analysé le niveau protéique, la partition ainsi que l'interaction de nos protéines d'intérêt et nous nous sommes intéressés à la dynamique entre les différentes MPTs de ces protéines. Enfin, nous savons que la desmine est une protéine de structure majeure du cytosquelette sarcomérique en particulier par son interaction avec de nombreuses protéines au sein d'un interactome complexe. Nous avons donc analysé cet interactome grâce à une analyse protéomique à la suite de changement de la O-GlcNAcylation.

Nous avons ainsi montré qu'un changement du taux global de la O-GlcNAcylation induisant un changement de phosphorylation de la desmine. Ce changement s'effectuerait pas le biais d'une modification de l'activité de kinases et serait corrélié à un changement de localisation subcellulaire de la desmine.

L'ensemble des données issues de ces travaux ont donc permis de définir plus précisément le rôle de la O-GlcNAcylation dans les mécanismes gouvernant la fonction sarcomérique, en particulier son impact sur les propriétés de la desmine. En effet, nos données caractérisent l'impact des changements de la O-GlcNAcylation sur l'organisation et la réorganisation du cytosquelette sarcomérique via la desmine, protéine majeure des filaments intermédiaires.

ABSTRACT

The strict organization of striated muscle myofibrils results in a semi-crystalline molecular structure regrouping the structural protein and the contractile (motor and regulatory) proteins. This sarcomeric organization is essential to ensure the generation and the transmission of force. In addition to the contractile proteins, the structure and function of the sarcomere also depends on a complex macromolecular assembly of structural proteins termed "sarcomeric cytoskeleton", which permits the precise and regulated localization of the contractile proteins and therefore an efficient development of force. Rather than being a static organization, the cytoskeleton is on the contrary a highly dynamic structure involving tight regulation of protein-protein interactions. The regulation of the protein-protein interaction involves post-translational modifications (MPTs), and in particular the phosphorylation.

However, recent data suggest that another post-translational modification, the atypical glycosylation O-GlcNAcylation, could be also essential to sarcomeric organization. Indeed, preliminary data of the lab showed that the modulation of global O-GlcNAcylation level in differentiated myotubes was closely associated to sarcomeric reorganization, correlated with the dynamic O-GlcNAcylation changes of myofibrillar proteins. Interestingly, the modulation of interaction between desmin, a key protein of intermediate filament, and the small heat shock protein α B-crystallin, its molecular chaperone, seems to be involved in these morphometric changes of the sarcomere. However, the precise role of O-GlcNAcylation on desmin and α B-crystallin, nor its interplay with other PTMs, is unknown.

Thus, the main objective of my thesis proposal is **the characterization of the role of O-GlcNAcylation on the desmin properties in skeletal muscle cells**. In particular, using pharmacological compounds leading to global O-GlcNAcylation level changes in myoblasts differentiated in myotubes. We analyzed protein level, partition and interaction of our proteins of interest and the interplay between these MPTs.

We have demonstrated that global O-GlcNAcylation level change leads to modulation of desmin phosphorylation. This change would take place through a modification of kinases activity and would be correlated to desmin subcellular localization change.

Altogether the data gained from my work permitted to finely define the role of O-GlcNAcylation in processes governing the sarcomeric function, and in larger extent, its impact on desmin properties. Indeed, our data characterize the impact of O-GlcNAcylation changes on organization and reorganization of sarcomeric cytoskeleton via desmin, the major protein of the intermediate filaments.

CURSUS ET TRAVAUX SCIENTIFIQUES

CURSUS

- **Doctorat Biologie Santé**
 - Université de Lille, 2018 - 2022
- **Master Biologie Santé**, option Neurosciences
 - Université de Lille, 2016 - 2018
- **Licence Science de la Vie et de la Terre**, parcours Biologie cellulaire et Physiologie
 - Université de Lille, 2013 - 2016

FORMATIONS ET DIPLOMES OBTENUS

- Formation diplômante : chirurgie expérimentale (mai 2021)
- Challenge Doc' (octobre 2020)
- Formation diplômante : expérimentation animale « réalisant et concevant » (nov./déc. 2019)
- Formations suivies avec l'école doctorale (116 ECTS/60)

PUBLICATIONS

- **Claeyssen C***, Bulangalire N*, Bastide B, Agbulut O, Cieniewski-Bernard C. Desmin and its chaperone, the α B-crystallin: how post-translational modifications modulate their functions in striated muscles? *Frontiers Physiol.*, *in redaction* (* co-premiers auteurs)
- **Claeyssen C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Global O-GlcNAcylation changes impact desmin phosphorylation and its partition toward cytoskeleton in C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes. *Sci Rep.* 2022 Jun;12(1):9831
- Lambert M, **Claeyssen C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. O-GlcNAcylation as a regulator of the functional activity and the structure of the sarcomere in skeletal muscle: an update review. 2019 May 20:e13301. doi: 10.1111/apha.13301
- **Claeyssen C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. O-GlcNAcylation/phosphorylation interplay on desmin fate: focus on its partition and its interaction with α B-crystalline, its molecular chaperone. *J Muscle Res Cell Motil* 40, 227-274 (EMC 2019, Résumé de congrès)
- Bensaïd S, Fabre C, **Claeyssen C**, Rajaei AY, Cieniewski-Bernard C. Combination of mechanical stimulation, nutrient supplementation and oxygenation treatment to counteract skeletal muscle atrophy consecutive to hypoxia., *in redaction*

COMMUNICATION ORALE

- **Claeyssen C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. O-GlcNAcylation and its interplay with phosphorylation on desmin behaviour: focus on its partition and its interaction with α B-crystallin, its molecular chaperone
 - 17^{èmes} journées de la Société Française de Myologie, Marseille, France (Novembre 2019)
- ➔ **Gain d'un « prix voyage » de 1000€** pour un congrès international

COMMUNICATIONS (POSTERS)

- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Global O-GlcNAcylation changes impact desmin phosphorylation and its partition toward cytoskeleton in C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes
 - 7^{ème} congrès international de myologie, Nice, France (Septembre 2022)
- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Global O-GlcNAcylation changes impact desmin phosphorylation and its partition toward cytoskeleton in C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes
 - Bulangalire N, **Clayssens C**, Agbulut, O, Cieniewski-Bernard C. The impacts of desmin network disorganisation on α B-crystallin and its post-translational modifications
 - 34^{ème} forum européen du cytosquelette, Hanovre, Allemagne (Mai 2022)
- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Impact of the phosphorylation / O-GlcNAcylation dynamics on desmin behaviour: focus on its partition and its interaction with its molecular chaperone, the α B-crystallin
 - 18^{èmes} journées de la Société Française de Myologie, Saint-Etienne, France (Nov. 2019)
- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. O-GlcNAcylation and its interplay with phosphorylation on desmin behaviour: focus on its partition and its interaction with α B-crystallin, its molecular chaperone
 - 25^{ème} congrès international de la Société Mondiale du Muscle, Halifax, Canada (Oct. 2020)
- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. O-GlcNAcylation and its interplay with phosphorylation on desmin behaviour: focus on its partition and its interaction with α B-crystallin, its molecular chaperone
 - 48^{ème} conférence européenne du muscle, Canterbury, Angleterre (Septembre 2019)
- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Impact of O-GlcNAcylation changes on desmin behaviour in differentiated myotubes
 - 6^{ème} congrès international de myologie, Bordeaux, France (Mars 2019)
- **Clayssens C**, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Impact of O-GlcNAcylation changes on differentiated myotubes.
 - 47^{ème} conférence européenne du muscle, Budapest, Hongrie (Septembre 2018)

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

- 10 et 11^{ème} programme « apprentis chercheurs » de l'arbre des connaissances (2019, 2020)
- Programme « 1000 chercheurs dans les écoles » de l'AFM-Téléthon (2018, 2019, 2020)
- Opération « Déclics » du cercle FSER (février 2020)

ENCADREMENT

- 3 étudiants de Master 1
- 5 étudiants de Licence
- 1 étudiante de BTS

ENSEIGNEMENT

L'ensemble de mes heures d'enseignements a été réalisé au sein du département Biologie de l'Université de Lille

Année 2019 - 2020

Interventions dans deux modules :

- 12h de TP Physiologie des grandes fonctions animales (Licence Science de la Vie)
- 2h d'intervention pour un mémoire bibliographique (Master Biologie-Santé)

Année 2020 - 2021

48h de TP dans différents modules :

- Physiologie animale (Licence Science de la Vie, parcours enseignement)
- Physiologie des grandes fonctions animales (Licence Science de la Vie)
- Biologie et physiologie (Licence FOCUS)

Année 2021-2022

Service de 192h (poste ATER) en TP et TD dans différents modules :

- Physiologie animale (Licence Science de la Vie, parcours enseignement)
- Physiologie des grandes fonctions animales
- Physiologie cellulaire (Licence Science de la Vie)
- Neurophysiologie Licence Science de la Vie, parcours enseignement)
- Biologie et physiologie (Licence FOCUS)
- Physiologie adaptative (Licence Science de la Vie)
- Cerveau et mouvement (Licence Science de la Vie)

RESPONSABILITES ADMINISTRATIVES

- Représentante étudiante élue au comité de pilotage de l'URéPSSS (2020-2022)
- Représentante étudiante élue au comité de direction de l'équipe APMS (2020-2022)
- Membre de Consulid (entre novembre 2020 et janvier 2022)

INDEX ET ABREVIATIONS

INDEX DES FIGURES

- Figure 1** : Schéma général de l'organisation du muscle squelettique
- Figure 2** : Organisation des fibres et faisceaux musculaires en coupe transversale.
- Figure 3** : Organisation de la triade
- Figure 4** : Structure complexe du sarcomère et bandes caractéristiques
- Figure 5** : Principaux constituants des myofilaments
- Figure 6** : Structure de la myosine
- Figure 7** : Organisation du complexe actine – myosine
- Figure 8** : Association des protéines régulatrices au myofilament d'actine
- Figure 9** : Mécanisme du couplage excitation – contraction
- Figure 10** : Phénomène de contraction / relâchement du sarcomère
- Figure 11** : Organisation complexe du cytosquelette sarcomérique
- Figure 12** : Représentation schématique de l'assemblage des protéines afin de stabiliser le sarcomère
- Figure 13** : Interactome au niveau de la strie Z et de la bande M
- Figure 14** : Les différents composants du cytosquelette
- Figure 15** : Les filaments intermédiaires : structure commune et différentes classes de protéines
- Figure 16** : Structure de la desmine
- Figure 17** : Organisation et polymérisation des filaments intermédiaires de desmine
- Figure 18** : Localisation cellulaire des filaments intermédiaires de desmine
- Figure 19** : Vaste interactome de la desmine
- Figure 20** : La desmine pour l'alignement des myofibrilles et la localisation subcellulaire d'organites
- Figure 21** : Les mutations de la desmine et leurs conséquences
- Figure 22** : Altération de l'architecture du muscle squelettique lors de desminopathies
- Figure 23** : Structure de l' α B-cristalline
- Figure 24** : L' α B-cristalline et interaction avec les FI
- Figure 25** : Conséquences dramatiques d'une mutation d'une protéine de structure du sarcomère
- Figure 26** : La complexification des organismes
- Figure 27** : Les différentes modifications post-traductionnelles
- Figure 28** : Différentes glycosylations spécifiques des domaines ou des classes de protéines
- Figure 29** : Recherche bibliographie des protéines O-GlcNAcylées
- Figure 30** : Mécanisme de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation
- Figure 31** : Voie de biosynthèse des hexosamines
- Figure 32** : Structure de l'OGT
- Figure 33** : Structure de l'OGA
- Figure 34** : Interaction entre OGT et OGA
- Figure 35** : Différentes techniques d'étude de la O-GlcNAcylation
- Figure 36** : Principe général de la Click chemistry
- Figure 37** : Différentes molécules pharmacologiques pour inhiber l'OGT et l'OGA
- Figure 38** : Impact de la O-GlcNAcylation sur de nombreux processus cellulaires

- Figure 39** : Impact de la O-GlcNAcylation sur l'homéostasie physiologique et le développement de pathologies
- Figure 40** : Les différentes familles de kinases
- Figure 41** : Mécanisme d'action de la PKA et de la PKC
- Figure 42** : Les différentes familles de phosphatases
- Figure 43** : Différents mécanismes d'action de la déphosphorylation
- Figure 44** : Représentation de la dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation
- Figure 45** : Différents types de dynamique entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation
- Figure 46** : Complexes moléculaires composés de kinases, phosphatases, de l'OGT et de l'OGA
- Figure 47** : Dynamique complexe de la O-GlcNAcylation et de la phosphorylation
- Figure 48** : Mécanisme de dégradation par le protéasome
- Figure 49** : Importance des calpaïnes dans la turn-over et la dégradation des protéines sarcomériques
- Figure 50** : Sites des modifications post-traductionnelles de la desmine chez différentes espèces
- Figure 51** : Sites majeurs de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation de l' α B-cristalline
- Figure 52** : Schéma récapitulatif de l'ensemble des protéines musculaires et leurs MPT
- Figure 53** : Localisation des enzymes régulatrices de la O-GlcNAcylation au sein de l'appareil contractile
- Figure 54** : Protéines O-GlcNAcylées impliquées dans la physiologie du muscle squelettique
- Figure 55** : Protéines O-GlcNAcylées impliquées dans le métabolisme glucidique et énergétique du muscle squelettique
- Figure 56** : Courbe T/pCa et impact de la O-GlcNAcylation sur les propriétés d'activation calcique
- Figure 57** : Morphométrie du sarcomère en fonction des variations du taux global de O-GlcNAcylation
- Figure 58** : Relation entre la O-GlcNAcylation, les voies de signalisation et l'atrophie dans le muscle squelettique
- Figure 59** : Structure des filaments intermédiaires de desmine associés à ses partenaires protéiques dans le cas de desminopathies
- Figure 60** : Agrégats protéiques caractéristiques des desminopathies
- Figure 61** : Représentation schématique de l'interaction entre desmine et l' α B-cristalline
- Figure 62** : Déroulement de la culture cellulaire
- Figure 63** : Récapitulatif des différentes extractions réalisées et des différents tampons utilisés
- Figure 64** : Marquage par immunofluorescence de la desmine dans les myotubes
- Figure 65** : Sélection des molécules pharmacologiques dans le but de moduler le taux de O-GlcNAcylation
- Figure 66** : Validation des traitements pharmacologiques
- Figure 67** : Quantification du taux global d'O-GlcNAcylation après traitement Ac₄-5S-GlcNAc ou Thiamet G
- Figure 68** : Quantification de l'expression de la desmine
- Figure 69** : Validation de la partition protéique suite à l'extraction différentielle
- Figure 70** : Nombre de protéines au sein de la fraction insoluble et cytosquelettique
- Figure 71** : Quantification de la quantité de matériel insoluble
- Figure 72** : Quantification de la partition de la desmine dans les fractions insolubles et cytosquelettique
- Figure 73** : Principe du Phostag-PAGE
- Figure 74** : Détection des différentes formes phosphorylées de la desmine après Phostag-PAGE
- Figure 75** : Test d'activité des phosphatases en gel
- Figure 76** : Détection en gel de l'activité de différentes phosphatases purifiées par un composé MUP
- Figure 77** : Détection en gel de l'activité de phosphatase

- Figure 78** : Analyse de l'activité des phosphatases impliquées dans la phosphorylation de la desmine
- Figure 79** : Quantification de l'activité de PKA et PKC
- Figure 80** : Quantification de l'état d'activation de CamKII et PAK
- Figure 81** : Quantification de l'activité de CamKII à la suite de différents traitements
- Figure 82** : Détection des différentes formes phosphorylées de la desmine après Phostag-PAGE
- Figure 83** : Quantification de la O-GlcNAcylation de CamKII
- Figure 84** : Quantification de la O-GlcNAcylation de la desmine
- Figure 85** : Détection de la desmine après Phostag-PAGE, avec ou sans purification préalable de sa forme O-GlcNAcylée
- Figure 86** : Principe de la technique électrophorétique de WGA-PAGE
- Figure 87** : Optimisation de la technique de WGA-PAGE pour nos deux protéines d'intérêt
- Figure 88** : Test de différentes WGA disponible
- Figure 89** : Détection des différentes formes O-GlcNAcylées et phosphorylées de la desmine
- Figure 90** : Quantification de l'ubiquitine totale et de la desmine
- Figure 91** : Marquage par immunofluorescence des filaments intermédiaires de desmine
- Figure 92** : Quantification de l'interaction de la desmine et de l' α B-cristalline
- Figure 93** : Principe de notre stratégie protéomique
- Figure 94** : Profils protéiques après co-immunoprécipitation de la desmine
- Figure 95** : Profils protéiques après co-immunoprécipitation de la desmine et électrophorèse bidimensionnelle
- Figure 96** : Optimisation du protocole de co-immunoprécipitation
- Figure 97** : Optimisation du protocole d'électrophorèse bidimensionnelle
- Figure 98** : Détection de l'interactome de la desmine par gel 2D
- Figure 99** : Quantification de l'expression de l' α B-cristalline
- Figure 100** : Quantification de la partition de α B-cristalline
- Figure 101** : Quantification de la phosphorylation de l' α B-cristalline
- Figure 102** : Quantification de la O-GlcNAcylation de l' α B-cristalline
- Figure 103** : Détection des différentes formes phosphorylées ou O-GlcNAcylées de l' α B-cristalline
- Figure 104** : Représentation schématique des variations de la O-GlcNAcylation, de la phosphorylation, de l'interaction et de partition de l' α B-cristalline et de la desmine
- Figure 105** : Structure de l' α B-cristalline et domaines d'interaction avec la desmine
- Figure 106** : Dynamique complexe entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation de la desmine
- Figure 107** : Méthode prédictive de YinOYang afin d'identifier les sites potentiels d'O-GlcNAcylation
- Figure 108** : Etapes de la stratégie d'identification des sites d'O-GlcNAcylation
- Figure 109** : Localisation de la O-GlcNAcylation globale et de la desmine en conditions de stress
- Figure 110** : Interaction entre la desmine et l' α B-cristalline en conditions de stress
- Figure 111** : Marquage fluorescent après une injection unique de DAPI vital dans le muscle
- Figure 112** : Impact de l'injection de siOGA

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Enzymes et des sites de phosphorylation de la desmine

Tableau 2 : Caractéristiques et dilutions des anticorps utilisées pour le western-blot

Tableau 3 : Tableau comparatif des trois protocoles de fractionnement

Tableau 4 : Propriétés de la desmine dans des myotubes

Tableau 5 : Effet de la caféine ou d'un co-traitement caféine et KN-93

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes conditions de marquage testées

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes images obtenues après le test des différents marquages

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différents tampons d'éluion utilisés pour la co-immunoprécipitation

Tableau 9 : Propriétés de l' α B-cristalline chez des myotubes

ABBREVIATIONS

- 2D : électrophorèse dibimensionnelle
- 5S : Ac₄-5S-GlcNAc ou peracétyl-5-thio-GlcNAc
- APS : Ammonium Persulfate
- ATP : adenosine triphosphate
- a.u : arbitrary units
- BSA : Bovine Serum Albumine
- CamK : Calcium/calmodulin-dependant protein kinase
- CLB : Cell Lysis Buffer
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DIB : Detergent Insoluble Buffer
- DMEN : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- DSB : Detergent Soluble Buffer
- DTT : Dithiothreitol
- ECL : Enhanced chemiluminescence
- EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique
- EBP : enhancer-binding protein
- ERK : extracellular signal-regulated kinase
- FI : Filaments intermédiaires
- GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
- GFAT : Glucose Fructose 6-phosphate AmidoTransferase
- GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine
- GSK3 : glycogen synthase kinase-3
- HRP : Horse Radish Peroxydase
- IAA : iodoacétamide
- IEF : isoélectrofocalisation
- IRS : insulin receptor substrate
- KO : Knock-Out
- LC-MS : liquid chromatography – mass spectrometry
- MHC : Myosin Heavy Chain
- MLC : Myosin Light Chain
- MPT : modifications post-traductionnelles
- MTT : méthylthiazoletétrazolium ou 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
- MUP : 4-méthylumbelliféryl phosphate
- NB : Nucléase Buffer
- OGA : O-GlcNAcase ou N-acétyl-β-D-glucosaminidase
- O-GlcNAcylation : O-N-acétyl-D-glucosaminylation
- OGT : O-GlcNAc transférase ou uridine diphospho-N-acétyl-β-D-glucosaminyl transférase
- PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- PAK : sérine/thréonine protéine kinase
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- PKA : Protéine Kinase A
- PKC : Protéine Kinase C
- PUGNAc : O-(2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranosylidène) amino-N-phénylcarbamate
- Rpm : Rotation par minute

- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
- sHSP : small Heat Shock Protein
- TBS-T : Tris Buffer Saline – Tween
- TEMED : tétraméthyléthylènediamine
- Thiamet G / ThG : thiazoline amino-éthyl gluco-configured
- UDP : Uridine Diphosphate
- WGA : Wheat Germ Agglutine

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Partie 1 : Le muscle squelettique	2
Avant-propos	3
I) Structure globale du muscle squelettique	4
A) Du muscle aux fibres musculaires	4
B) Le sarcomère, unité fonctionnelle du muscle	5
a) Protéines motrices	6
➤ Myosine	7
➤ Actine.....	7
➤ Complexe actine – myosine.....	8
b) Protéines régulatrices.....	8
➤ Tropomyosine.....	8
➤ Troponine	9
c) Protéines structurales	9
C) Mécanisme de contraction du sarcomère.....	9
II) Le cytosquelette sarcomérique	11
A) Les filaments intermédiaires (FI)	13
a) Rôle des filaments intermédiaires.....	14
b) Structure et types de filaments intermédiaires	14
c) Filaments intermédiaires et muscle squelettique	15
B) La desmine.....	16
a) Embryogenèse	16
b) Structure de la desmine	17
c) Localisation cellulaire	18
d) Interactome et fonctions de la desmine	20
e) Mécanismes physiopathologiques	21
f) Modèles animaux et pathologiques	22
➤ Modèles murins.....	23
➤ Modèle du poisson zèbre	23
➤ Modèles de myopathies ou cardiomyopathies	24
C) Les protéines chaperonnes : l'αB-cristalline	25
Partie 2 : Les modifications post-traductionnelles.....	28
Avant-propos.....	29

I)	La O-GlcNAcylation.....	32
A)	La O-GlcNAcylation : une glycosylation atypique.....	32
B)	La voie de biosynthèse des hexosamines.....	34
C)	Les enzymes impliquées : OGT et OGA	35
a)	OGT.....	35
b)	OGA	36
D)	Les techniques d'études de la O-GlcNAcylation.....	37
a)	Anticorps et lectines.....	38
b)	Click-chemistry	38
c)	Libération des glycanes	39
d)	Utilisation des gels 2D	39
e)	Approches génétique et pharmacologique.....	39
f)	Méthodes protéomiques.....	40
E)	La O-GlcNAcylation impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires.....	41
II)	La phosphorylation et sa dynamique avec la O-GlcNAcylation.....	43
A)	Mécanismes d'action des kinases et phosphatases.....	43
B)	La dynamique phosphorylation / O-GlcNAcylation.....	46
C)	Les mécanismes sous-jacents et sites modifiés	47
D)	L'interaction entre les enzymes responsables des mécanismes.....	48
Partie 3 : MPT et physiopathologie du muscle squelettique		50
I)	Rôle de l'ubiquitination	51
II)	Rôle de la phosphorylation.....	52
A)	Effets de la phosphorylation sur la desmine	53
B)	Effets de la phosphorylation sur l' α B-cristalline	55
III)	Rôle de la O-GlcNAcylation.....	56
A)	La O-GlcNAcylation, un médiateur physiologique du muscle squelettique.....	60
a)	Impact sur le métabolisme énergétique	60
b)	Impact sur l'activité contractile.....	62
c)	Impact sur la structure du muscle.....	63
d)	Rôle dans l'atrophie musculaire et certaines pathologies	65
B)	O-GlcNAcylation de la desmine et de l' α B-cristalline.....	67
IV)	Modification des MPT et physiopathologie des troubles musculaires	68
A)	La desmine.....	68
B)	L' α B-cristalline	69
C)	Cas des desminopathies	70

PROBLEMATIQUE	73
MATERIEL ET METHODES	76
I) Culture cellulaire	77
A) Prolifération cellulaire	77
B) Ensemencement et différenciation des cellules	77
C) Traitement des cellules	78
II) Dosage de la viabilité cellulaire	78
III) Protocole de marquage	78
A) Marquage des cellules	78
B) Marquage des filaments intermédiaires de desmine	79
IV) Préparation des échantillons	79
A) Extraction et fractionnement des protéines	79
a) Extrait total et natif	80
b) Fractions soluble et cytosquelettique	80
c) Fractions soluble et insoluble	81
B) Déphosphorylation des échantillons	81
C) Dé-O-GlcNAcylation des échantillons	81
D) Dosage de la concentration en protéines	81
V) Techniques d'enrichissement des protéines	82
A) Immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées	82
B) Co-immunoprécipitation des protéines	82
VI) Techniques électrophorétiques	82
A) SDS-PAGE	82
B) Phos-tag PAGE	83
C) WGA-PAGE	84
VII) Analyse protéique par western-blot	84
A) Saturation / incubation anticorps primaires	84
B) Incubation anticorps secondaires / Révélation	84
VIII) Analyse de l'activité des kinases et des phosphatases	85
A) Dosage de l'activité de PKA et PKC	85
B) Détection « en gel » de l'activité des phosphatases	85
IX) Identification des protéines des fractions insoluble et cytosquelettique	86
A) Précipitation des échantillons	86
B) Réduction, alkylation et digestion des protéines	86
C) Analyse par spectrométrie de masse de type nano-LC-MS	86
X) Analyse statistique	87

RESULTATS.....	88
Avant-propos.....	89
I) Modulation du taux global d'O-GlcNAcylation.....	91
A) Approches méthodologiques pour moduler le taux de O-GlcNAcylation.....	91
B) Modulation du taux global d'O-GlcNAcylation des cellules C2C12.....	92
II) Impact de changement d'O-GlcNAcylation sur la desmine.....	94
A) Expression de la desmine.....	94
B) Partition de la desmine.....	94
a) Choix et validation des protocoles de fractionnement.....	94
b) Analyse de la fraction insoluble.....	96
c) Analyse de la partition de la desmine.....	96
C) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation sur la phosphorylation de la desmine ...	97
a) Choix de la technique d'étude de la phosphorylation : Phostag-PAGE.....	97
b) Analyse de la phosphorylation de la desmine.....	98
c) Identification des enzymes impliquées dans la phosphorylation de la desmine.....	98
➤ Analyse sans à priori des activités de phosphatases.....	99
• Choix et validation de la technique d'analyse des phosphatases : MUP.....	99
• Analyse des activités phosphatases.....	101
➤ Analyse de l'activité des kinases.....	101
• Analyse de l'état d'activation ou de l'activité des kinases.....	101
• Validation de l'implication de CamKII.....	102
• O-GlcNAcylation de CamKII.....	104
D) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation sur la O-GlcNAcylation de la desmine .	104
a) Analyse de la O-GlcNAcylation de la desmine.....	104
b) Dynamique O-GlcNAc / phosphorylation de la desmine.....	105
E) Pattern de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation de la desmine selon la fraction ...	105
a) Choix et optimisation de la technique WGA-PAGE.....	105
b) Pattern de la desmine selon la fraction soluble, insoluble et cytosquelettique.....	107
F) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation global sur l'ubiquitination.....	108
G) Impact d'un changement du taux global de O-GlcNAcylation sur la desmine : bilan .	109
III) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation sur le réseau de desmine.....	110
A) Analyse des filaments intermédiaires de desmine.....	110
a) Optimisation du marquage filaments intermédiaires desmine.....	110
b) Analyse des filaments par microscopie confocale.....	113
B) Analyse de l'interactome de la desmine.....	114
a) Données préliminaires.....	114

b)	Mise en place et optimisation d'un protocole d'analyse protéomique	115
➤	Stratégie globale.....	115
➤	Optimisation du protocole de co-immunoprécipitation	115
➤	Optimisation de la séparation électrophorétique.....	118
c)	Analyse protéomique différentielle de l'interactome de la desmine	118
IV)	Impact de changement d'O-GlcNAcylation sur l'αB-cristalline	119
A)	Expression.....	119
B)	Partition.....	120
C)	Modifications post-traductionnelles : phosphorylation et O-GlcNAcylation	120
D)	Pattern selon les fractions.....	121
E)	Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation sur l'αB-cristalline : bilan	122
DISCUSSION		124
I)	La modulation du taux global de la O-GlcNAcylation : une approche permettant de moduler la phosphorylation de la desmine	125
II)	La desmine comme garant de l'intégrité du muscle squelettique notamment via ses interactions protéiques : quel rôle des MPT ?	129
III)	L'identification des sites d'O-GlcNAcylation de la desmine pour mieux comprendre son implication dans les mécanismes physiopathologiques	131
IV)	Conclusion	134
PERSPECTIVES.....		136
I)	Finalisation de l'étude de l'interactome de la desmine	137
II)	Modulation de la phosphorylation et impact sur la O-GlcNAcylation	137
III)	Vers une nouvelle stratégie d'étude de la O-GlcNAcylation	138
A)	L'identification de nouveaux sites d'O-GlcNAcylation	138
B)	La mutation des sites O-GlcNAcylés pour mieux comprendre les répercussions de la O-GlcNAcylation sur les fonctions des protéines d'intérêt.....	139
IV)	Analyser les propriétés de la desmine en conditions de stress	140
A)	Analyse des MPT de la desmine	140
B)	Analyse de l'interaction avec l'αB-cristalline	141
V)	Analyser les répercussions fonctionnelles des MPT.....	142
VI)	Analyse des MPT dans des modèles pathologiques.....	144
A)	Modèles cellulaires.....	145
B)	Modèles animaux	145
BIBLIOGRAPHIE.....		147
ANNEXES.....		180

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Partie 1 : Le muscle squelettique

Avant-propos

L'ensemble des muscles de l'organisme ont la capacité de se contracter. Dans ce manuscrit, nous allons porter notre attention sur le muscle strié squelettique. Comme son nom l'indique, ce type de muscle va se fixer au squelette osseux via les tendons. Contrairement au muscle cardiaque et aux muscles lisses tapissant de nombreux organes et les vaisseaux sanguins qui se contractent uniquement de manière involontaire, le muscle strié squelettique va se contracter de manière volontaire sous le contrôle du système nerveux somatique et du système nerveux autonome dans le cadre des réflexes et du maintien de la posture.

Chez l'Homme, il existe environ 650 muscles squelettiques représentant 40% de la masse corporelle et ayant certaines particularités. En effet, c'est un tissu excitable qui pourra réagir à un ordre ou à une stimulation en générant une activité électrique qui conduira à la production d'une activité mécanique. De plus, il présente une certaine tonicité puisqu'il est toujours soumis à un état de force que ce soit au repos ou à l'exercice. Enfin, il est contractile et élastique, ce qui signifie qu'il a la capacité de se raccourcir, de se déformer et de s'allonger avant de reprendre sa position et sa forme initiales.

En se contractant, ces muscles vont assurer plusieurs fonctions parmi lesquelles nous pouvons citer la production de la force, le maintien de l'équilibre ainsi que la posture et enfin la production d'un mouvement dans le cadre de la locomotion. Cette contraction est permise par la conversion d'un signal électrique en énergie chimique puis en énergie mécanique. Outre cet aspect mécanique, le muscle participe également au maintien d'une certaine homéostasie métabolique. En effet, il intervient dans le stockage de différents substrats (notamment le glucose, sous forme de glycogène, ou les acides aminés, sous forme de protéines mobilisables) et participe à la thermorégulation en produisant de la chaleur.

En plus des caractéristiques énoncées ci-dessus, le muscle squelettique est également doté d'une très grande plasticité ; sa structure, sa masse et ses propriétés peuvent être modulées selon les conditions physiologiques (âge, état nutritionnel, activité physique, fatigue, état de santé, etc) (*Frontera et Ochala 2015*). Cette propriété est liée à la composition protéique du muscle squelettique. En effet, il contient 50 à 75% des protéines totales de l'organisme ; très hétérogène, ce tissu est alors très important pour le maintien de l'homéostasie protéique.

I) Structure globale du muscle squelettique

Ce tissu tire son nom du fait qu'il est relié au squelette osseux par l'intermédiaire des tendons. Le muscle strié squelettique est une machine complexe, efficace et précise. En effet, il est composé de faisceaux musculaires correspondant à l'assemblage de différentes fibres, elles-mêmes composées de structures contractiles : les myofibrilles. Ces myofibrilles représentent un alignement de plusieurs unités fonctionnelles du muscle appelées sarcomères (**figure 1**).

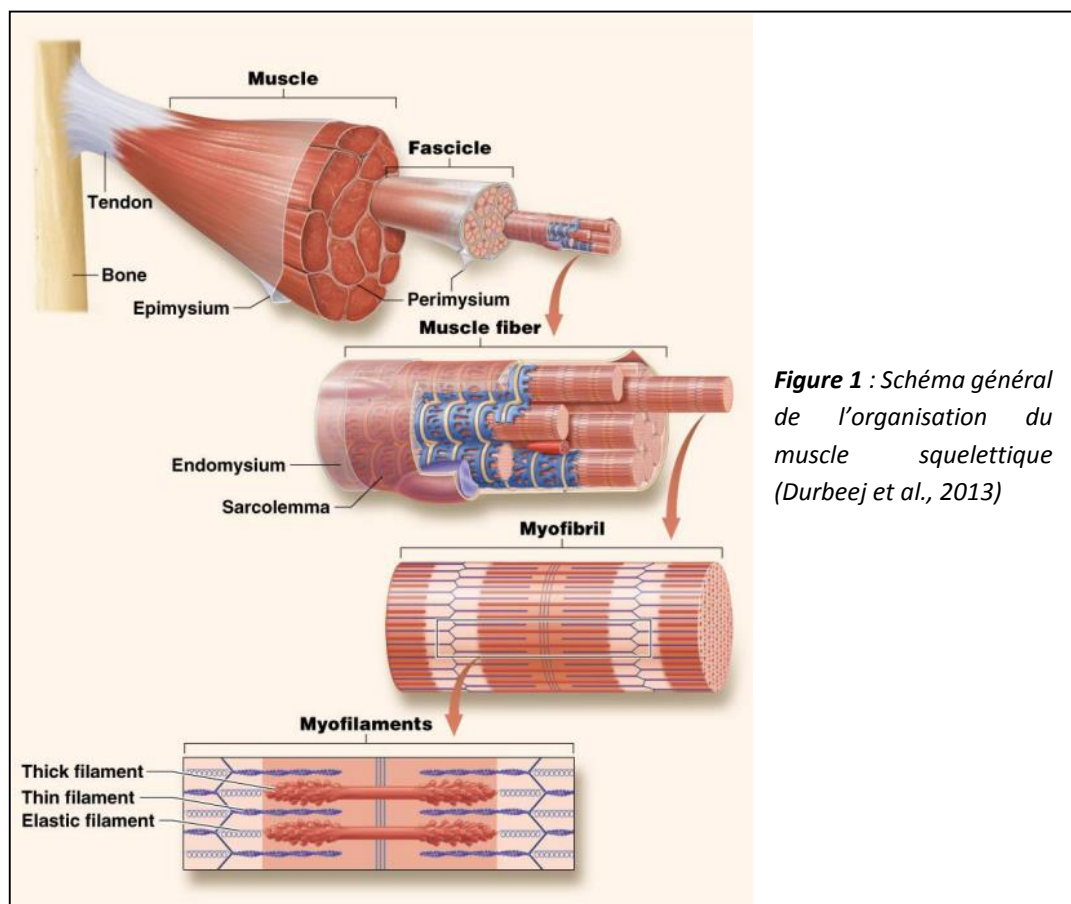
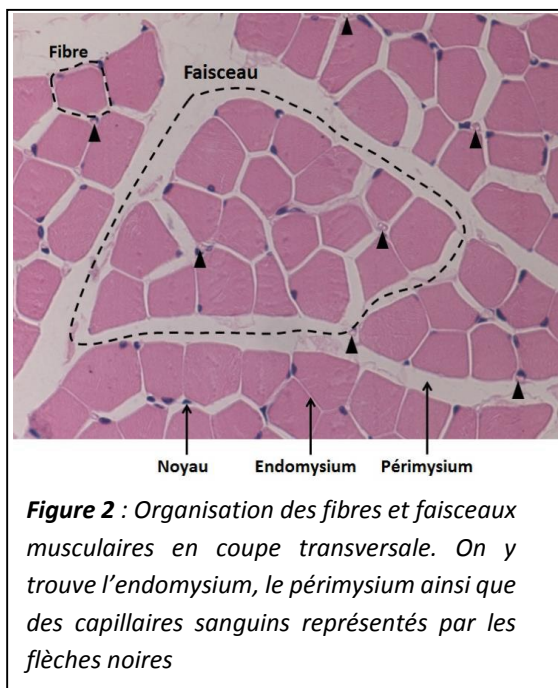


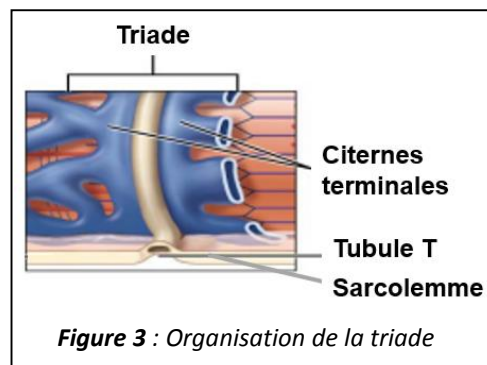
Figure 1 : Schéma général de l'organisation du muscle squelettique (Durbeej et al., 2013)

A) Du muscle aux fibres musculaires

Le muscle squelettique est entouré dans sa globalité par une gaine de tissu conjonctif appelée épimysium. Au sein de ce muscle, nous allons trouver différents faisceaux contenant chacun de nombreuses fibres musculaires. Ces fibres musculaires sont des cellules avec plusieurs noyaux périphériques provenant de la fusion de myocytes, cellules mononuclées. Alors que chaque faisceau est entouré d'une membrane conjonctive appelée périmysium, les fibres musculaires sont entourées d'une gaine appelée endomysium (**Figures 1 et 2**). Ces différentes membranes conjonctives ont un rôle important puisqu'en plus d'assurer la protection des différentes structures, elles vont permettre leur maintien. A l'intérieur de l'endomysium, on trouve une membrane plasmique au contact des



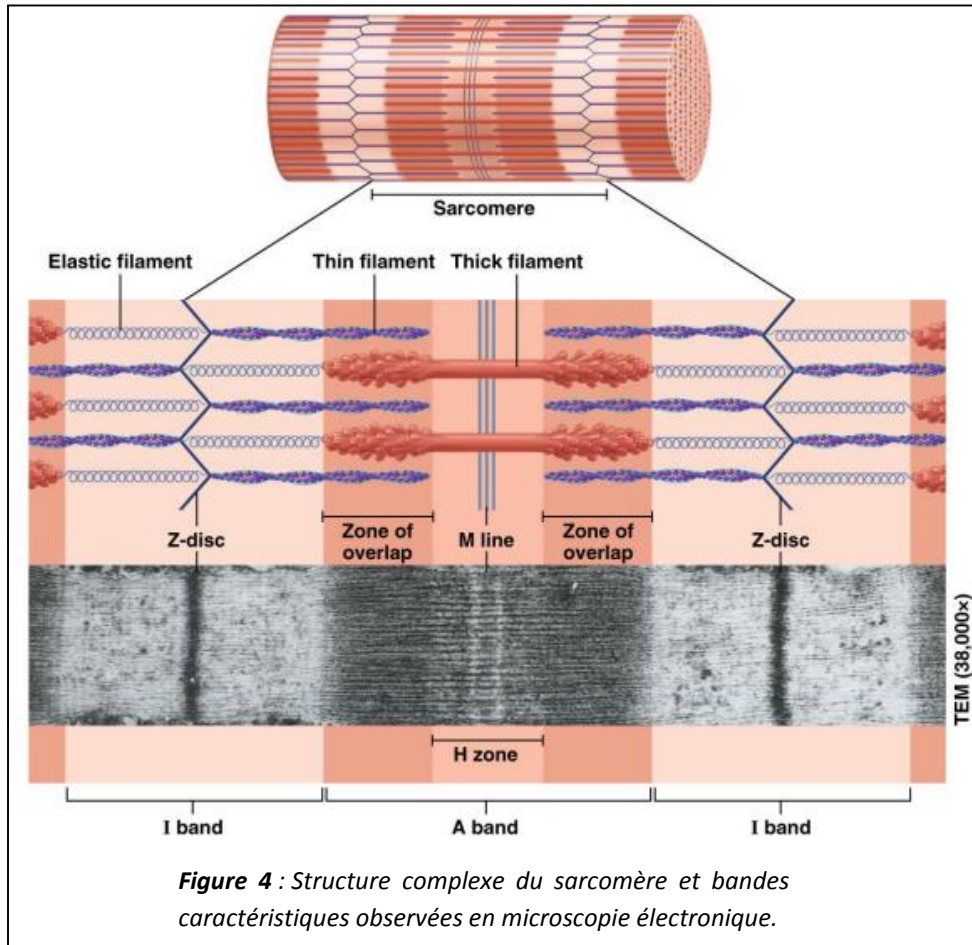
myofibrilles appelée sarcolemme, présentant la propriété d'excitabilité (**figures 1 et 3**). Cette membrane a la particularité de présenter des invaginations, les tubules transverses impliqués dans la conduction de l'influx électrique au niveau de ces fibres.



Le muscle étant un tissu ayant besoin d'un apport en oxygène et en nutriments très important, il est très largement vascularisé. Ce tissu est également fortement innervé. En effet, afin d'assurer la contraction musculaire, plusieurs fibres vont être innervées par un même motoneurone dans le but de former une unité motrice. Cette connexion s'effectue *via* la jonction neuromusculaire au niveau du sarcolemme.

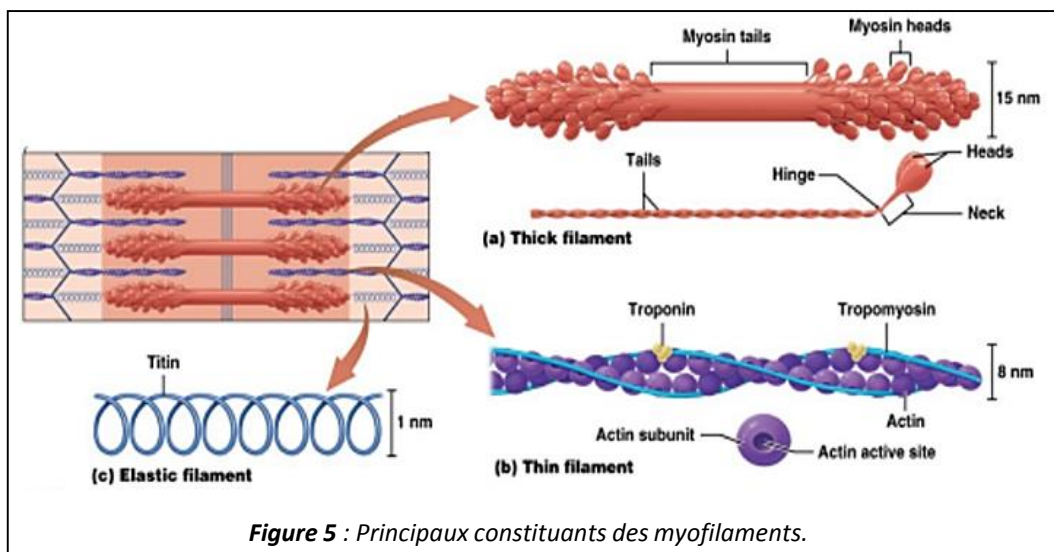
B) Le sarcomère, unité fonctionnelle du muscle

Le sarcomère, assure la contraction du muscle et permet de générer une force grâce à un réseau protéique interconnecté et extrêmement complexe (K. A. Clark *et al.* 2002). En effet, il possède une organisation moléculaire très précise et régulière de myofilaments fins d'actine et épais de myosine, correspondant aux protéines motrices auxquelles vont être associées des protéines régulatrices de la fonction contractile. Cet assemblage très ordonné donne naissance à différentes stries et bandes caractéristiques composant et délimitant ce sarcomère, facilement observable en microscopie électronique (**figure 4**). En effet, celui-ci s'étend entre deux stries Z ; en son centre, on trouve la ligne M ((Millman 1998) (**figure 4**). Afin d'assurer la bonne organisation, l'élasticité et le soutien des protéines motrices et régulatrices, on trouve également de nombreuses protéines de structure. Parmi elles, nous pouvons citer la desmine, protéine majeure des filaments intermédiaires formant un réseau tridimensionnel autour des myofibrilles, ou encore la titine, constituant une composante élastique.



a) Protéines motrices

Ces protéines vont être responsables *via* leur déformation de la production de l'énergie mécanique permettant la contraction simultanée de l'ensemble des sarcomères donnant lieu à la contraction des fibres musculaires et donc du muscle dans sa globalité (**figure 5**).



➤ Myosine

Cette protéine est le constituant majeur des filaments épais et elle va s'ancrer au niveau de la ligne M, point central du sarcomère puisqu'elle est située à égale distance de chaque strie Z. Chaque molécule de myosine mesure 140 nm de long et est formée de 6 sous-unités :

- Deux chaînes lourdes (MHC : myosin heavy chain) enroulées l'une autour de l'autre pour former la queue de myosine du côté C-terminal tandis que l'extrémité N-terminale forme une partie globulaire appelée « tête de myosine » (Rayment et al. 1993; Craig et Woodhead 2006). Cette « tête » de myosine est subdivisée en deux avec une sous-unité permettant la fixation de l'ATP et ayant une activité ATPase et l'autre sous-unité qui possède un site de fixation à l'actine (Rüegg et al. 2002) ;
- Quatre chaînes légères (MLC : myosin light chain) correspondant aux parties essentielles et régulatrices de la molécule de myosine protéine (Gelfi, Vasso, et Cerretelli 2011).

Afin de former le filament épais de 1,6 μm de long pour un diamètre de 15 nm, il faut environ 200 à 300 molécules associées de manière antiparallèle avec les têtes de myosine dirigées vers l'extérieur du filament grâce à un segment spécifique de la « tête » de myosine servant de levier (**figure 6**) (Warrick et Spudich 1987; Gordon, Homsher, et Regnier 2000).

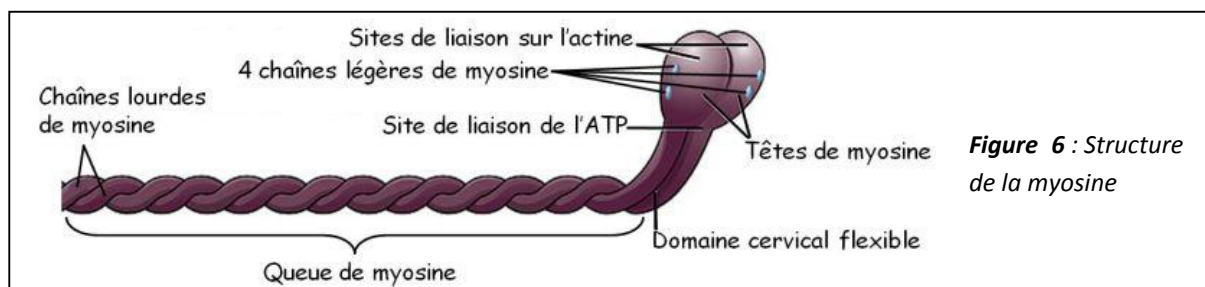


Figure 6 : Structure de la myosine

➤ Actine squelettique

La deuxième protéine motrice fondamentale au sein du sarcomère est l'actine squelettique. C'est une protéine globulaire (actine G) d'environ 4 à 5 nm de diamètre et qui présente quatre domaines ayant des sites particuliers (fixation aux têtes de myosine, liaison à des cations divalents comme le calcium et liaison à l'ATP essentiel à la polymérisation) (Squire et al. 2005). En effet, l'actine G est capable de s'assembler avec d'autres molécules afin de former l'actine filamenteuse (actine F) (K. C. Holmes et al. 1990; Kenneth C. Holmes et al. 2003). Il faut ensuite l'assemblage de deux polymères d'actine F sous forme d'hélice pour former le filament fin d'actine mesurant 1 μm de longueur pour un diamètre de 7 nm en moyenne (**figure 5**). Ce filament ainsi formé va s'ancrer au niveau de la strie Z.

➤ Complexe actine – myosine

Ces deux molécules ainsi formées vont former un complexe actine – myosine par le biais de ponts d'union entre elles au sein du sarcomère afin de permettre la contraction des fibres musculaires. On trouvera alors des molécules de myosine au niveau de la bande H, des molécules d'actine au niveau de la bande I et le complexe actine – myosine au niveau de la bande A permettant ainsi une organisation semi-cristalline du sarcomère (**figure 7**).

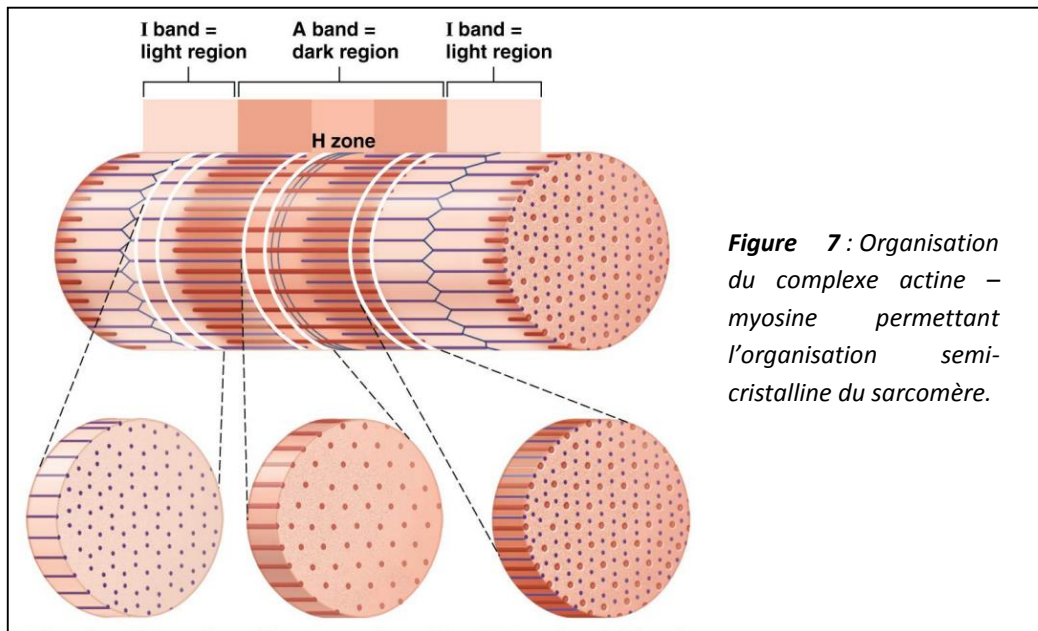


Figure 7 : Organisation du complexe actine – myosine permettant l'organisation semi-cristalline du sarcomère.

b) Protéines régulatrices

Elles sont situées au niveau des myofilaments moteurs, en particulier les filaments fins d'actine, et permettent d'initier et de stopper les liaisons moléculaires permettant l'activité mécanique, à savoir la contraction. Les deux protéines régulatrices principales correspondent à la tropomyosine et au complexe des troponines.

➤ Tropomyosine

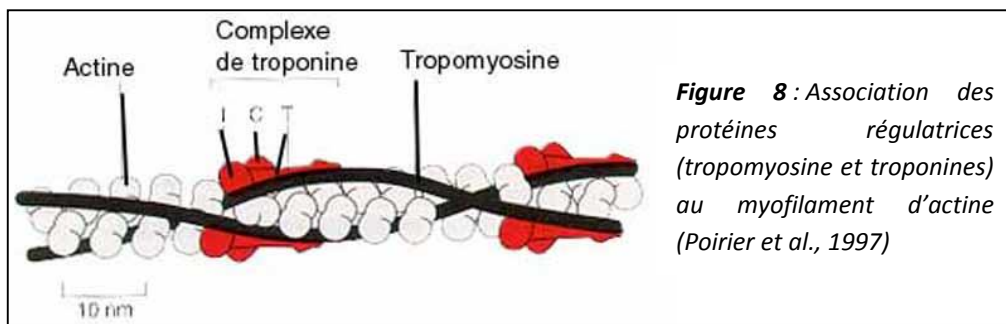
La molécule de tropomyosine est constituée de deux chaînes associées en hélice, formant un filament d'environ 38 nm (*Sodek et al. 1972; Pearlstone et Smillie 1977*). Elle se situe dans les sillons du filament fin d'actine sur une longueur équivalente à 7 molécules d'actine G (*Ebashi et al., 1969; Schmidt et al., 2015*) et va permettre de stabiliser les filaments d'actine F et de moduler l'interaction avec la myosine (*Cooper 2002; Nevzorov et Levitsky 2011*) (**figure 8**).

➤ Troponine

La troponine est formée à partir de 3 sous-unités : C, T, I.

- La sous-unité C est composée d'un domaine de fixation pour le calcium favorisant l'interaction entre l'actine et la myosine et donc la contraction ;
- La sous-unité T permet la fixation à une extrémité de la tropomyosine ;
- La sous-unité I possède un domaine qui se lie fortement à l'actine G lorsque les concentrations de calcium sont basses, limitant l'interaction et la formation de ponts entre l'actine et la myosine.

Ce complexe va venir se fixer sur la tropomyosine à raison de 7 monomères d'actine G (Kenneth C. Holmes et Lehman 2008) (**figure 8**).



c) Protéines structurales

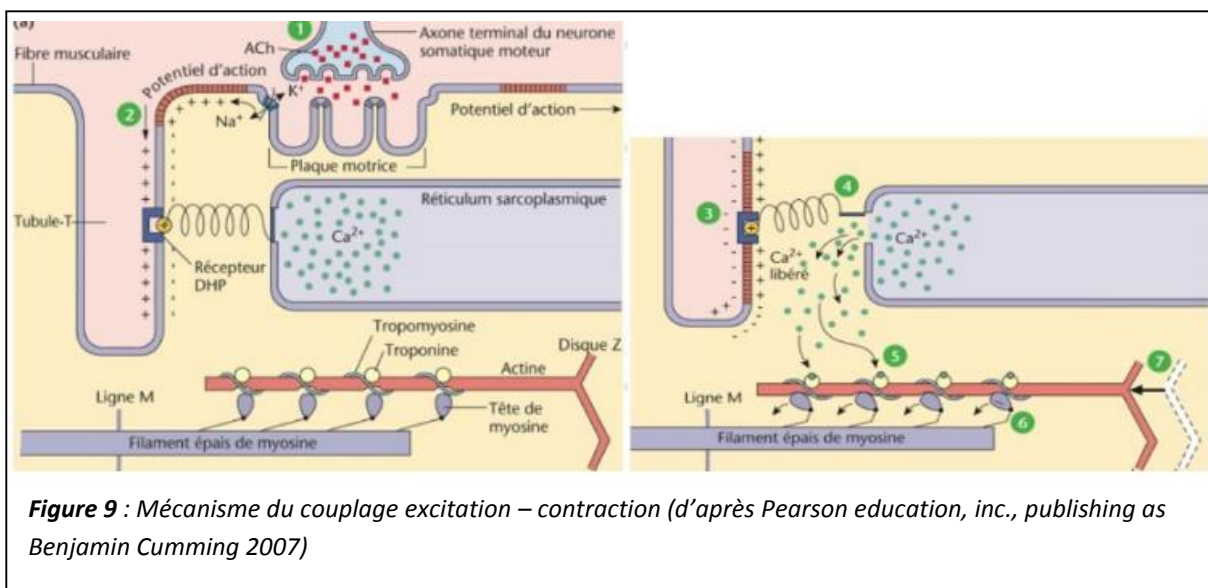
Ces protéines sont essentielles au maintien de l'organisation stricte et régulière du sarcomère. Outre leur rôle de stabilisation du cytosquelette sarcomérique, elles permettent également de maintenir l'intégrité structurale de la cellule. En effet, elles vont permettre l'ancrage des myofibrilles au sarcolemme mais également de positionner certains organites majeurs tels que les noyaux ou les mitochondries. Cette partie sera développée de manière plus précise dans le paragraphe III « Le cytosquelette sarcomérique ».

C) Mécanisme de contraction du sarcomère

Comme nous l'avons vu, l'assemblage moléculaire du sarcomère va être essentiel pour sa contraction et la génération d'une force. Cependant, un autre élément très important va entrer en jeu : la triade. Celle-ci correspond à un tubule transverse correspondant à une invagination du sarcolemme associé de chaque côté à une citerne terminale du réticulum sarcoplasmique (**figure 3**).

Des mécanismes successifs vont alors être mis en place afin de transformer un signal électrique en travail mécanique, la contraction du sarcomère : c'est ce qu'on appelle le couplage excitation-contraction dont la **figure 9** reprend les grandes étapes :

- (1) Un stimulus nerveux arrive à la jonction musculaire libérant ainsi des neurotransmetteurs dans la fente synaptique ;
- (2) Cela entraîne l'apparition d'un potentiel d'action (PA) dont la dépolarisation va se propager le long du sarcolemme jusqu'aux tubules transverses ;
- (3) Ceux-ci possèdent des récepteurs sensibles à la dépolarisation (DHPR : récepteurs à la dihydropyridine) qui vont changer de conformation ;
- (4) Cette modification va permettre l'activation de récepteurs RyR (récepteurs à la ryanodine) au niveau du réticulum sarcoplasmique libérant ainsi du calcium dans le sarcoplasme ;
- (5) Le calcium ainsi libéré va pouvoir aller se fixer au niveau des protéines régulatrices, en particulier la troponine afin de permettre l'interaction entre l'actine et la myosine formant les ponts acto-myosine ;
- (6) Les têtes de myosine vont ensuite basculer ;
- (7) Afin que les filaments d'actine puissent glisser vers le centre du sarcomère.



L'ensemble de ces étapes, en particulier la force générée par la myosine transférée à l'ensemble du sarcomère, va permettre le glissement des filaments fins d'actine sur les filaments épais de myosine et conduire à la contraction. Lorsque le sarcomère se contracte, cela entraîne une diminution de sa longueur (**figure 10**) (Frontera et Ochala 2015).

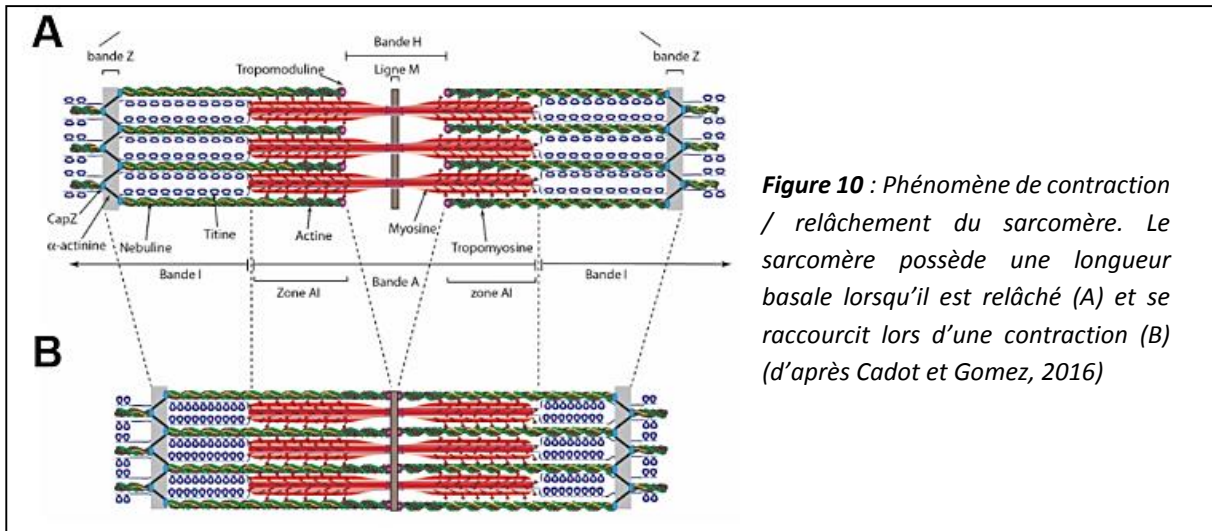


Figure 10 : Phénomène de contraction / relâchement du sarcomère. Le sarcomère possède une longueur basale lorsqu'il est relâché (A) et se raccourcit lors d'une contraction (B) (d'après Cadot et Gomez, 2016)

II) Le cytosquelette sarcomérique

Afin d'assurer de manière optimale la contraction, le muscle squelettique se doit d'avoir une organisation très précise et régulière et hautement contrôlée. Cette structure semi-cristalline (**figure 7**) est notamment permise grâce à un réseau cytosquelettique complexe, interconnecté et très dynamique (*Gautel et Djinić-Carugo 2016*) alliant des changements coordonnés dans la synthèse et la dégradation protéique (*Boonyarom et Inui 2006*) ainsi qu'un assemblage et un maintien par des

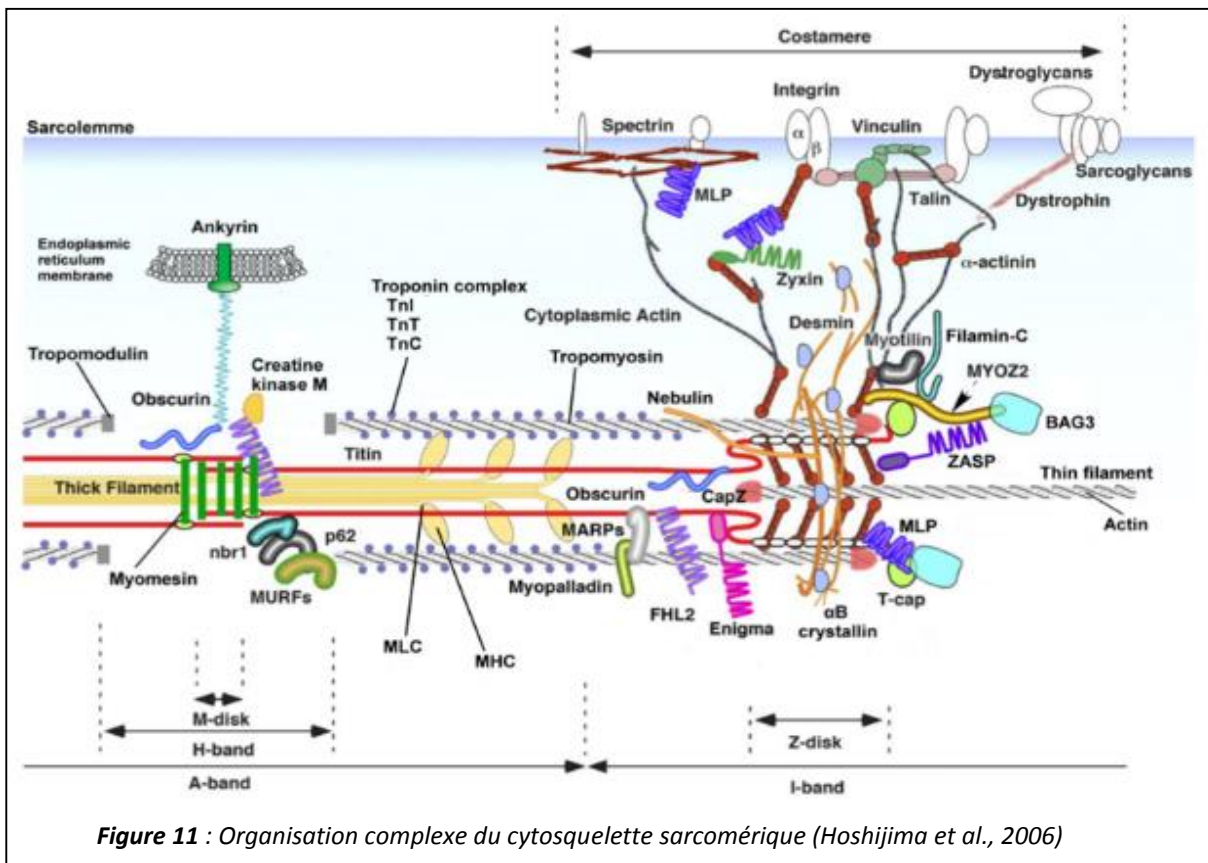
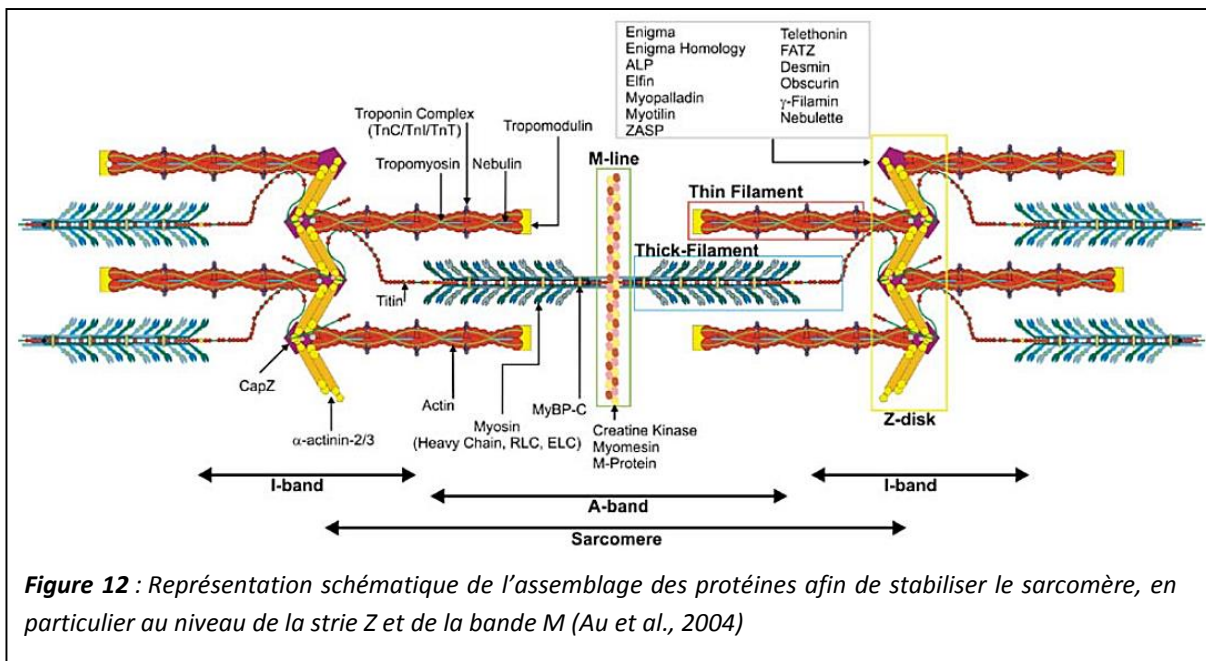


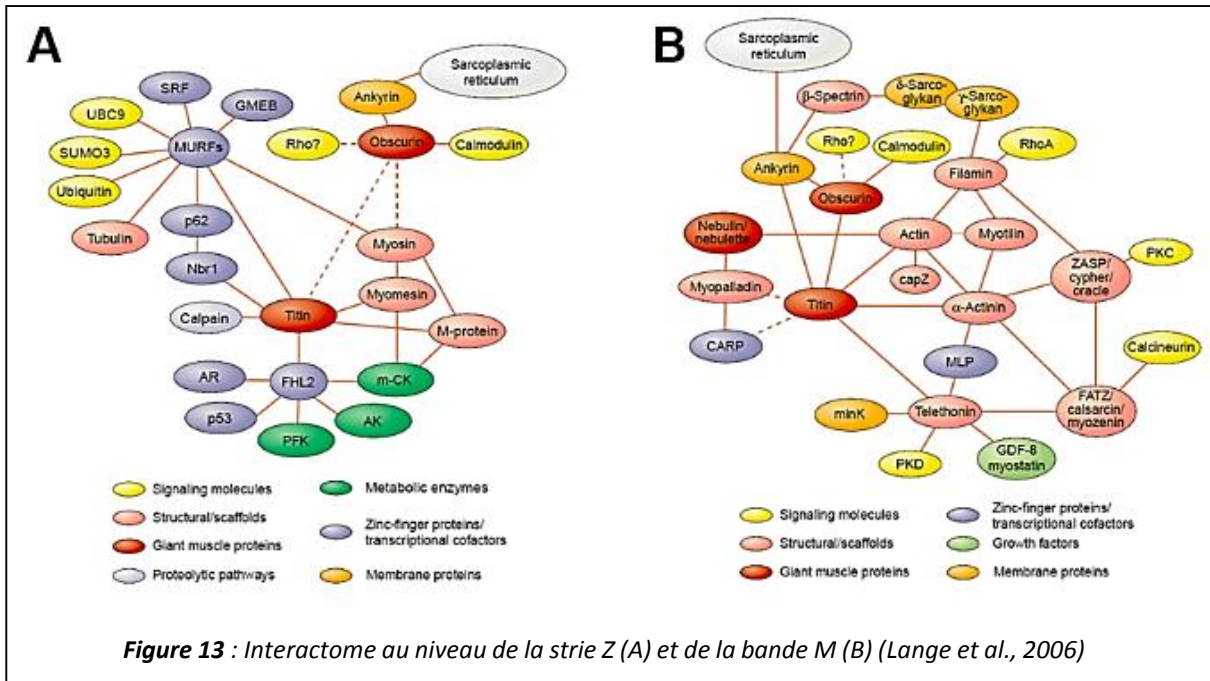
Figure 11 : Organisation complexe du cytosquelette sarcomérique (*Hoshijima et al., 2006*)

protéines de structure (K. A. Clark *et al.* 2002). Parmi ces protéines, nous pouvons citer la titine, la nébuline et la dystrophine qui maintiennent la bonne architecture de la fibre musculaire et assurent une stabilité mécanique, une certaine élasticité et permettent la transmission de la force (K. A. Clark *et al.* 2002; Gautel 2011; Henderson *et al.* 2017) (**figure 11**) De plus, ces protéines permettent un ancrage de leurs protéines partenaires à des endroits stratégiques et spécifiques du sarcomère, la ligne M et la strie Z, modulé par des changements d'interactions protéine-protéine (Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.* 2009). La ligne M stabilise le sarcomère en maintenant l'écart entre les filaments de myosine constant et en les liant entre eux de façon parallèle grâce aux protéines telles que la myoméline et la protéine M. La strie Z quant à elle correspond à une zone d'ancrage, de structuration et de maintien des filaments d'actine *via* de nombreuses protéines structurales associées comme BAG3, ZASP, la myotiline, la filamine C, l' α B-cristalline et l' α -actinine (**figure 12**).



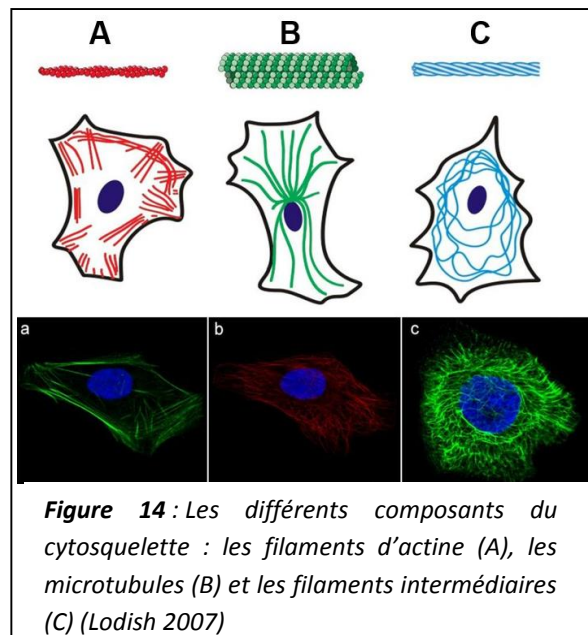
Enfin, outre les protéines de structure, d'autres protéines vont réguler la dynamique de ces deux complexes macromoléculaires que sont la ligne M et la strie Z. Ainsi, des protéines des voies de signalisation et des systèmes de protéolyse telles que l'ubiquitine, SUMO3, la calmoduline et la protéine kinase C sont également localisées au niveau de ces structures (**figure 13**), et sont essentielles à l'équilibre synthèse/dégradation des protéines myofibrillaires (Bonaldo *et Sandri* 2013; Boonyarom *et Inui* 2006; Knöll, Buyandelger, *et Lab* 2011). Une mauvaise conformation de l'une des protéines de structure peut avoir des conséquences dramatiques au niveau de l'architecture du muscle squelettique et donc de sa fonction. C'est le cas de la myopathie de Duchenne, une dystrophie liée à une anomalie sur le gène codant pour la dystrophine. Cette dernière ne pouvant plus jouer son rôle sur la structure de la fibre musculaire, il en résulte des dysfonctions et des faiblesses musculaires ayant de graves conséquences chez les individus atteints de cette pathologie (Falzarano *et al.* 2015). En plus

des protéines citées précédemment, il existe une autre catégorie de protéines essentielles à l'élaboration et la structuration de ce cytosquelette sarcomérique : les filaments intermédiaires (FI).



A) Les filaments intermédiaires (FI)

Il existe différents types de filaments au sein de la cellule musculaire. En effet, les filaments fins d'actine d'environ 5 nm de diamètre se trouvent en périphérie de la cellule et permettent de moduler la morphologie de la cellule musculaire (**figure 14**). Les microtubules, épais filaments creux d'environ 25 nm de diamètre provenant de l'assemblage d'une protéine globulaire, la tubuline, vont jouer un rôle dans le trafic vésiculaire, la différenciation et la prolifération (Becker, Leone, et Engel 2020). Outre ces fonctions, ils pourront également intervenir dans le positionnement des organites tels que les noyaux et les mitochondries. Pour cela, ils seront assistés des filaments intermédiaires retrouvés dans de nombreux endroits de la cellule (**figure 14**). Dénommés ainsi puisque leur diamètre d'environ 10 nm se trouve entre celui des deux types de filament cités précédemment, ils font partie d'une grande famille comprenant environ 70 membres (Harald Herrmann et al. 2003).



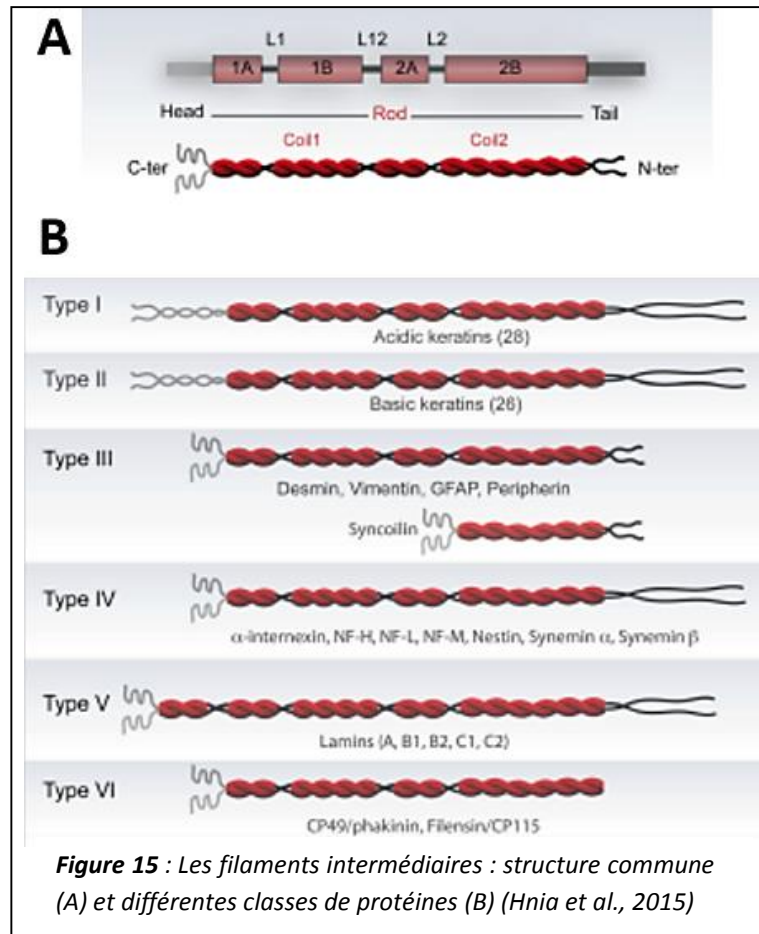
a) Rôle des filaments intermédiaires

Les FI sont des structures spécifiques pour chaque type cellulaire. Dans le muscle, leur rôle principal est le maintien de l'architecture et de la forme de la cellule musculaire permettant une résistance face aux stress mécaniques (Herrmann et al. 2009; Huber et al. 2015; Goldmann 2018). Ils participent également à la structuration de la cellule par leur interaction avec certains organites tels que les mitochondries, les noyaux (Schwarz et Leube 2016; Mado et al. 2019) ou les structures d'adhésion comme les adhésions focales ou les desmosomes (Etienne-Manneville 2018) formant ainsi un véritable réseau tridimensionnel autour des myofibrilles. Initialement considérés comme étant une structure statique, il est maintenant connu que les filaments intermédiaires sont très dynamiques et capables de répondre rapidement à la demande cellulaire. De plus, les FI représentent un point nodal pour les cellules musculaires puisqu'ils interagissent avec un très grand nombre de protéines en particulier des protéines des voies de signalisation (Kim et Coulombe 2007). Grâce à ces interactions, les FI sont alors des cibles et des intervenants dans la signalisation intracellulaire. De ce fait, les FI contribuent à la dynamique des cellules (développement, prolifération, migration, vieillissement, apoptose, ...) et de manière plus générale à l'homéostasie tissulaire (régénération, cicatrisation, ...) (Pallari et Eriksson 2006; Hyder et al. 2011; Dey et al., 2014; Cheng et Eriksson 2017; Sanghvi-Shah et Weber 2017). De manière importante, les FI sont impliqués dans environ 80 maladies humaines (Szeverenyi et al. 2008; Omary 2009; Lowery et al. 2015; Nishimura et al., 2019).

b) Structure et types de filaments intermédiaires

Les protéines de la famille des FI vont présenter une structure commune très conservée au cours de l'évolution ne nécessitant pas d'ATP pour leur polymérisation. Celle-ci présente une tête globulaire variable, un domaine central conservé et une queue variable avec des domaines globulaires. Le domaine central est composé de quatre super-hélices nommées 1A, 1B, 2A et 2B séparées par des domaines de liaison flexibles L1, L12 et L2 (Hnia et al. 2015) (**figure 15A**). Puisque très nombreux, ces FI vont être subdivisés en six différentes classes selon leur structure primaire, leurs propriétés d'assemblage, leur possibilité de co-polymériser et leur expression dans les tissus (Herrmann et Aebi, 2000) Les FI de type I et II correspondent aux cytokératines acides et basiques des cellules épithéliales, respectivement. Ils forment obligatoirement des hétéropolymères entre eux (une acide et une basique) à l'inverse des FI de type III qui peuvent également former des homopolymères avec eux-mêmes. Ces derniers comprennent la vimentine, la desmine, la GFAP (glial fibrillary acidic protein), la périphérine et la syncoiline. Les FI de type IV comprennent le triplet de neurofilament (NF-L, NF-M et NF-H), l' α -internexine, la nestine et les synémines α et β . Les différentes laminines (A, B1, B2, C1 et C2)

font partie des FI de type V. Enfin, les FI de type VI englobent les protéines CP49/phakinine et filensine/CP115 (**figure 15B**) (Hnia et al. 2015).



c) Filaments intermédiaires et muscle squelettique

Dans les cellules musculaires matures, les FI les plus représentés sont les protéines des FI de type III et en particulier la desmine (John E. Eriksson et al. 2009) qui présente une très forte homologie de séquence avec la vimentine des cellules mésenchymateuses et la GFAP des cellules gliales. Mais on retrouvera également des protéines qui ne sont pas spécifiques au muscle telles que la synémine et la paranémine qui sont co-exprimées et peuvent former des copolymères avec la desmine (Granger et Lazarides 1980; Breckler et Lazarides 1982). La nestine qui est normalement une protéine spécifique des cellules souches du cerveau peut également polymériser avec des protéines des FI de type III (Steinert et al. 1999). Elle est présente dans les muscles cardiaque et squelettiques immatures mais également aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses du muscle squelettique mature (Kachinsky, Dominov, et Miller 1994). Au sein des muscles striés, on trouve également des FI de la famille des cytokératines, en particulier la kératine 8 et 19 qui forment un hétéropolymère *in vitro* et qui se trouvent au niveau du sarcolemme mais également à la périphérie des stries Z comme la desmine (Stone et al. 2005).

B) La desmine

Décrite pour la première fois en 1976 (*Lazarides et Hubbard 1976*), sa purification en 1977 (*Izant et Lazarides 1977*) a permis la production d'anticorps et la détermination de sa distribution dans de nombreux tissus (*Lazarides 1980*). En particulier, la desmine est la protéine majeure des filaments intermédiaires des cellules musculaires et endothéliales. Chez l'Homme, elle représenterait respectivement 2% et 0,35% des protéines totales dans le cœur et dans le muscle (*Price 1984*). Le gène *DES*, seul gène codant pour la desmine a été identifié par Capetanaki et collaborateurs en 1984 sur le chromosome 2q35 (*Y. G. Capetanaki, Ngai, et Lazarides 1984*) et a été séquencé dans de nombreuses espèces telles que le rat, la souris, la vache, le cochon, le hamster, le poulet, le xénope et le poisson zèbre (*Strelkov, Herrmann, et Aebi 2003; M. L. Costa et al. 2004*). Bien qu'uniquement exprimée chez les vertébrés, des protéines homologues sont retrouvées dans de nombreux organismes (*Bär et al. 2004*). Les premiers knock-out de la desmine ont été mis au point par les équipes de Capetaniaki et Paulin (*Milner et al. 1996; Z. Li et al. 1997*) qui ont permis de mettre en lumière les fonctionnalités de la protéine.

a) Embryogenèse

Cette protéine représente l'un des premiers marqueurs protéiques du tissu musculaire dans l'embryogénèse puisqu'elle est détectée dans les somites (*H. Herrmann, Fouquet, et Franke 1989; Y. Capetanaki, Milner, et Weitzer 1997*). Bien que présente au début du développement des cellules musculaires, elle n'est exprimée qu'à un faible niveau qui augmente à mesure que la cellule s'approche de sa différenciation terminale. A l'inverse, la vimentine, une protéine similaire à la desmine, est présente en grande quantité pendant l'embryogénèse et dans les cellules musculaires immatures et diminue lorsque la cellule se différencie (*Farrell, Sax, et Zehner 1990*). Il existerait donc une certaine interaction entre ces deux protéines afin de permettre la détermination et la différenciation des cellules musculaires (*Sarnat 1992; Y. Yang et Makita 1996*). En effet, lors de l'élongation et la fusion des myoblastes, la desmine serait intégrée aux filaments de vimentine préexistants dans les cellules musculaires en culture dans le but de former des brins longitudinaux. Ces derniers seraient transformés en filaments transverses lors de la maturation des myotubes et seraient localisés entre les myofibrilles au niveau des stries Z (*Barbet, Thornell, et Butler-Browne 1991*).

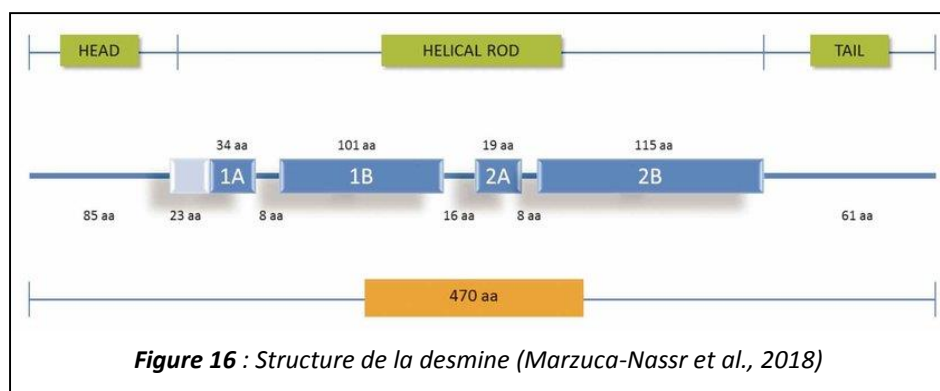
Des études ont montré qu'un manque de desmine bloque la fusion des myoblastes et donc la formation des myotubes dans des cellules musculaires C2C12 mais également dans des corps embryonnaires (*Schultheiss et al. 1991*). De manière intéressante, les souris knock-out pour la desmine sont viables, fertiles et se développent normalement puisque la genèse de leurs myofibrilles ainsi que

les premiers stades de différenciation se passent correctement, ce qui pourrait indiquer une compensation par d'autres FI tels que les cytokératines (*Hnia et al. 2015*). Toutefois, elles présentent des altérations plus tardivement dans leur vie. En effet, pendant la régénération, le délai de prolifération et de fusion est retardé et la seconde vague de genèse myofibrillaire est supprimée (*Z. Li et al. 1997; Y. Capetanaki, Milner, et Weitzer 1997; Smythe et al. 2001*). Pendant le développement, l'expression de la desmine précède d'autres protéines spécifiques du muscle telles que MyoD, la myogénine et MRF4 suggérant que la desmine puisse intervenir comme modulateur dans l'initiation et la différenciation myogénique (*Lazarides 1982; H. Li et Capetanaki 1993*).

b) Structure de la desmine

La desmine est une protéine de 470 acides aminés pour un poids moléculaire de 53,5 kDa. Comme toutes les protéines des filaments intermédiaires, elle présente une structure bien conservée au cours de l'évolution en trois parties avec une tête en N-terminal, un domaine central α -hélicoïdal et une queue en C-terminal (**figure 16**) (*Agnetti, Herrmann, et Cohen 2022*). Concernant la desmine,

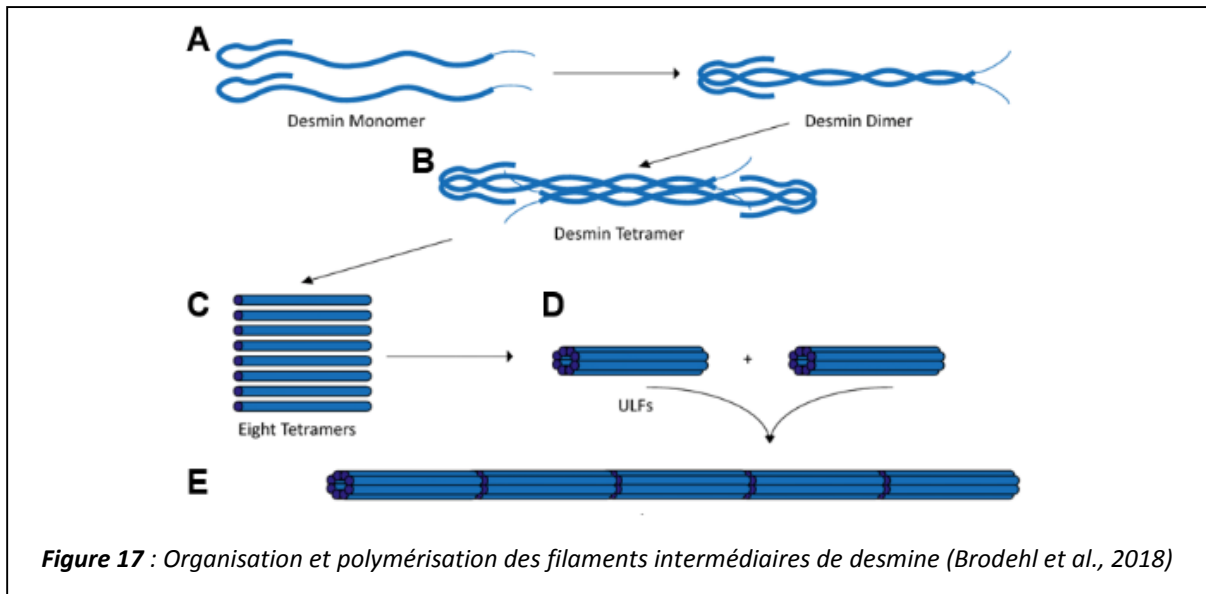
son domaine central en hélice joue un rôle dans sa polymérisation et se compose de quatre domaines α -hélicoïdaux appelés 1A, 1B, 2A et 2B



séparés par trois domaines liaisons L1, L12 et L2. La tête de la desmine, composée de 84 acides aminés et riche en résidus arginine, intervient également dans le processus de polymérisation et dans l'assemblage des FI tandis que la queue est impliquée dans l'organisation globale des FI de desmine dans un réseau filamenteux présentant des propriétés de viscoélasticité (*Goldman et al. 2012; Charrier et Janmey 2016; Charrier et al. 2018*). C'est dans ce sens qu'une troncature du domaine C-terminal conduit au désassemblage des FI (*Schultheiss et al., 1991*).

La desmine est une protéine hautement insoluble qui s'assemble par un processus en plusieurs étapes. Dans un premier temps, deux monomères de desmine s'assemblent de manière parallèle pour former un dimère et s'enroulent formant le domaine α -hélicoïdal central (**Figure 17A**). Ensuite, deux dimères en hélice s'assemblent de manière antiparallèle pour former un tétramère (**Figure 17B**). Enfin, l'assemblage latéral de plusieurs tétramères (**Figure 17C**) conduit à la formation d'un filament

d'environ 60 nm de long et 16 nm de diamètre correspondant à l'unité de base du filament (ULF : Unit-Lenght Filament) (**Figure 17D**) (Harald Herrmann et al. 2009; Clemen et al. 2013; Brodehl, Gaertner-Rommel, et Milting 2018; Agnetti, Herrmann, et Cohen 2022). Ces filaments s'assemblent bout à bout de manière spontanée pour former des filaments de plus en plus longs, menant à terme aux filaments intermédiaires de plusieurs centaines de nanomètres de long (**figure 17E**). Ces FI de desmine constituent un réseau filamenteux tridimensionnel permettant l'ancrage de nombreuses protéines à travers un interactome complexe.



c) Localisation cellulaire

Le meilleur moyen d'observer la desmine dans la cellule est l'utilisation d'un microscope après marquage par immunofluorescence. Cette technique a permis de décrire la desmine dans plusieurs tissus tels que les muscles lisses, le muscle cardiaque ou le muscle squelettique. Dans les cellules musculaires lisses, la desmine apparaît sur l'ensemble de la cellule mais plus particulièrement au niveau des corps denses. Ces derniers correspondent au centre de la contraction et sont les homologues des stries Z des muscles squelettiques et des disques intercalaires du muscle cardiaque puisqu'ils possèdent de l' α -actinine ainsi que de l'actine (Stromer et Bendayan 1988). Au sein des cellules cardiaques, la desmine est retrouvée préférentiellement au niveau des desmosomes, connectée aux cadhérines et aux cytokératines. Ces desmosomes permettent de faire le lien latéral entre chaque myocytes (Tokuyasu, Dutton, et Singer 1983). Elle est également retrouvée au niveau des disques intercalaires afin de lier les sarcomères à la membrane. Pour rappel, ce sont les cellules cardiaques qui possèdent la plus grande proportion de desmine.

Dans le muscle squelettique, la desmine est présente dans l'ensemble de la cellule mais plus particulièrement à certains endroits tels que la strie Z et les costamères. Ces derniers sont des structures périodiques du sarcolemme, connectées aux stries Z *via* les FI de desmine (Ervasti 2003). Le plus connu est le DPC (dystroglycan protein complex) qui connecte l'actine *via* la dystrophine au β -dystroglycan transmembranaire, qui se lie à l' α -dystroglycan extracellulaire interagissant lui-même avec la laminine 2 et le collagène (figure 18A). Un autre complexe fait intervenir la spectrine, la taline, la paxiline, la vinculine et des intégrines transmembranaires qui se lient à la fibronectine, la laminine et le collagène. La desmine est capable de se fixer à ces complexes *via* la plectine et la dysferline (Konieczny *et al.* 2008) mais également *via* la fixation de la synémine à la dystrophine par l' α -dystrobrevine (Bhosle *et al.* 2006) et ainsi permettre de faire le lien entre les myofibrilles et le sarcolemme (M. L. Costa *et al.* 2004; Hnia *et al.* 2015). Outre la strie Z et les costamères, la desmine est observée au niveau de la jonction myotendineuse liée à la nestine (Tidball 1992) et à la jonction neuromusculaire associée aux récepteurs cholinergiques (Mitsui *et al.* 2000). De plus, il semblerait qu'il y ait un lien possible entre la desmine et le réticulum sarcoplasmique (Hnia *et al.* 2011) (figure 18B).

Enfin, la desmine, comme tous les FI, est retrouvée autour du noyau pour chacun de ces types de cellules musculaires. Dans le muscle squelettique, elle va interagir avec les laminines nucléaires, la plectine et les microtubules afin de connecter le noyau aux sarcomères mais également aux autres organelles telles que les mitochondries et les lysosomes (Cartaud *et al.* 1995; Yassemi Capetanaki *et al.* 2007; Hnia *et al.* 2015) (figure 18C).

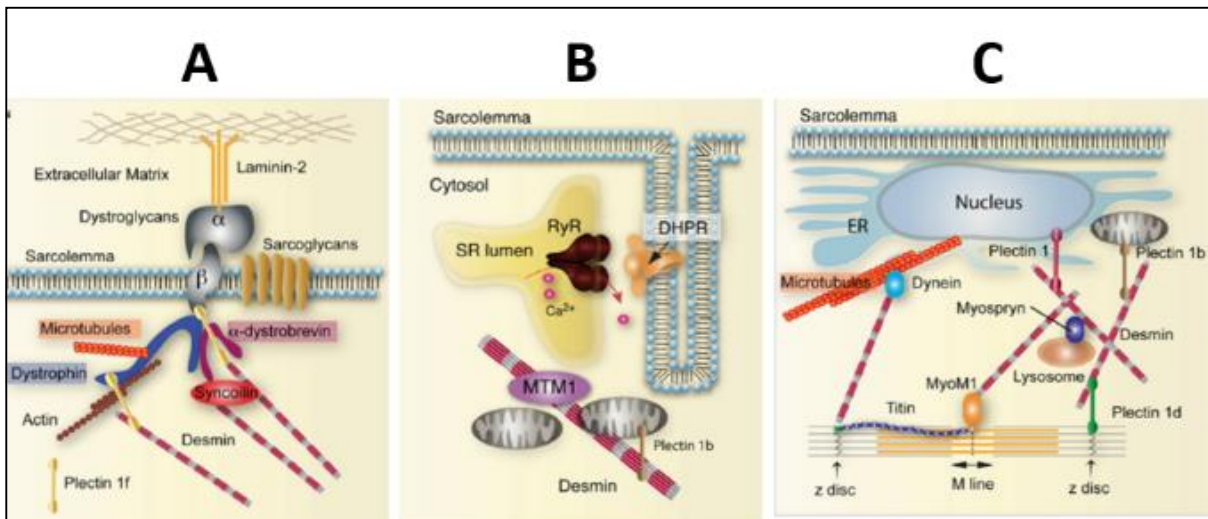
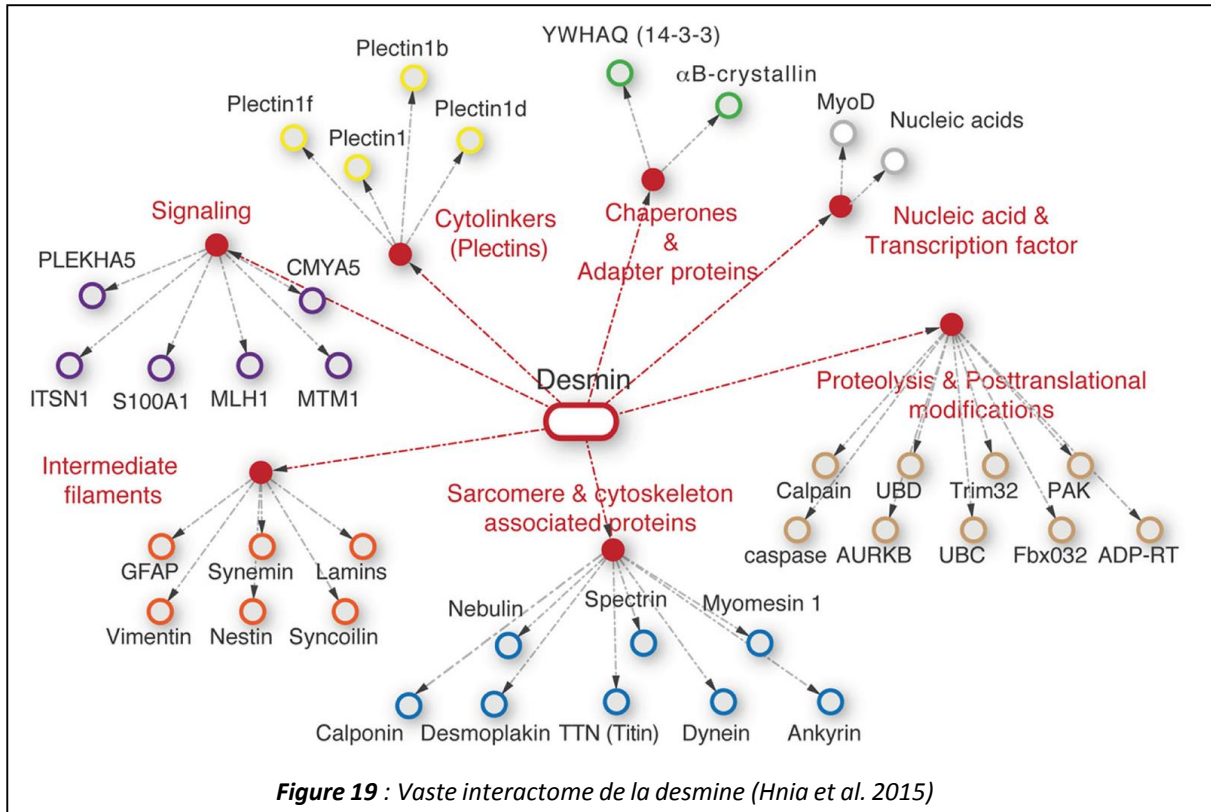


Figure 18 : Localisation cellulaire des filaments intermédiaires de desmine. (A) Association des filaments de desmine avec les costamères, permettant l'ancrage des myofibrilles à la membrane (A). Lien possible de la desmine au réticulum sarcoplasmique (B). Réseau de desmine connectant les noyaux aux autres organelles (C) (modifié d'après Hnia *et al.* 2015)

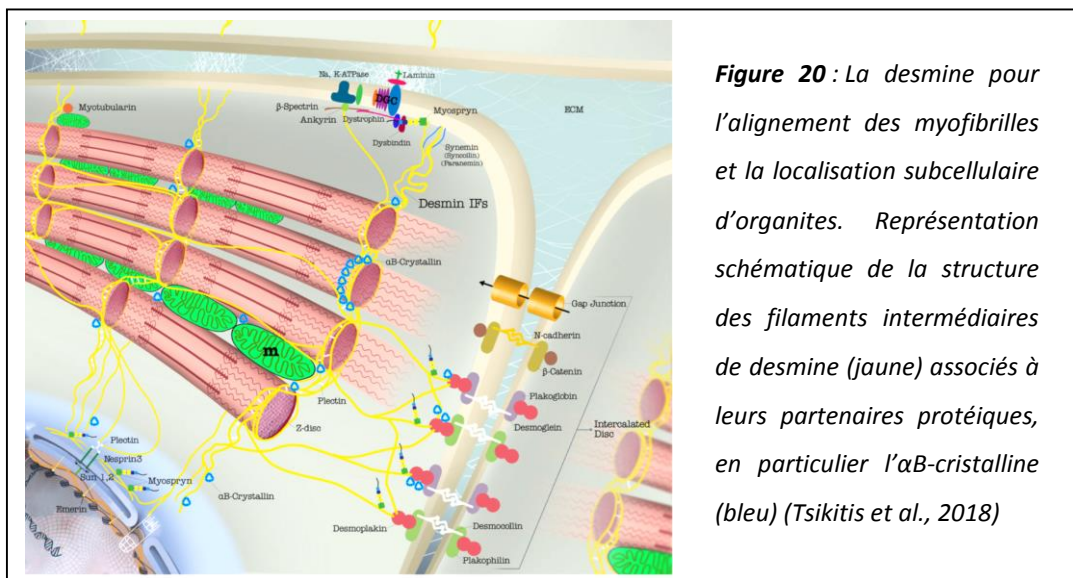
d) Interactome et fonctions de la desmine

En effet, l'interactome de la desmine est vaste (M. L. Costa et al. 2004; Hnia et al. 2015; Hol et Capetanaki 2017; Tsikitis et al. 2018) puisque la desmine interagit avec les filaments intermédiaires, les protéines associées à la membrane et au sarcomère ainsi qu'avec les protéines chaperonnes et des voies de signalisation (Clemen et al. 2013; Hnia et al. 2015) (**figure 19**).



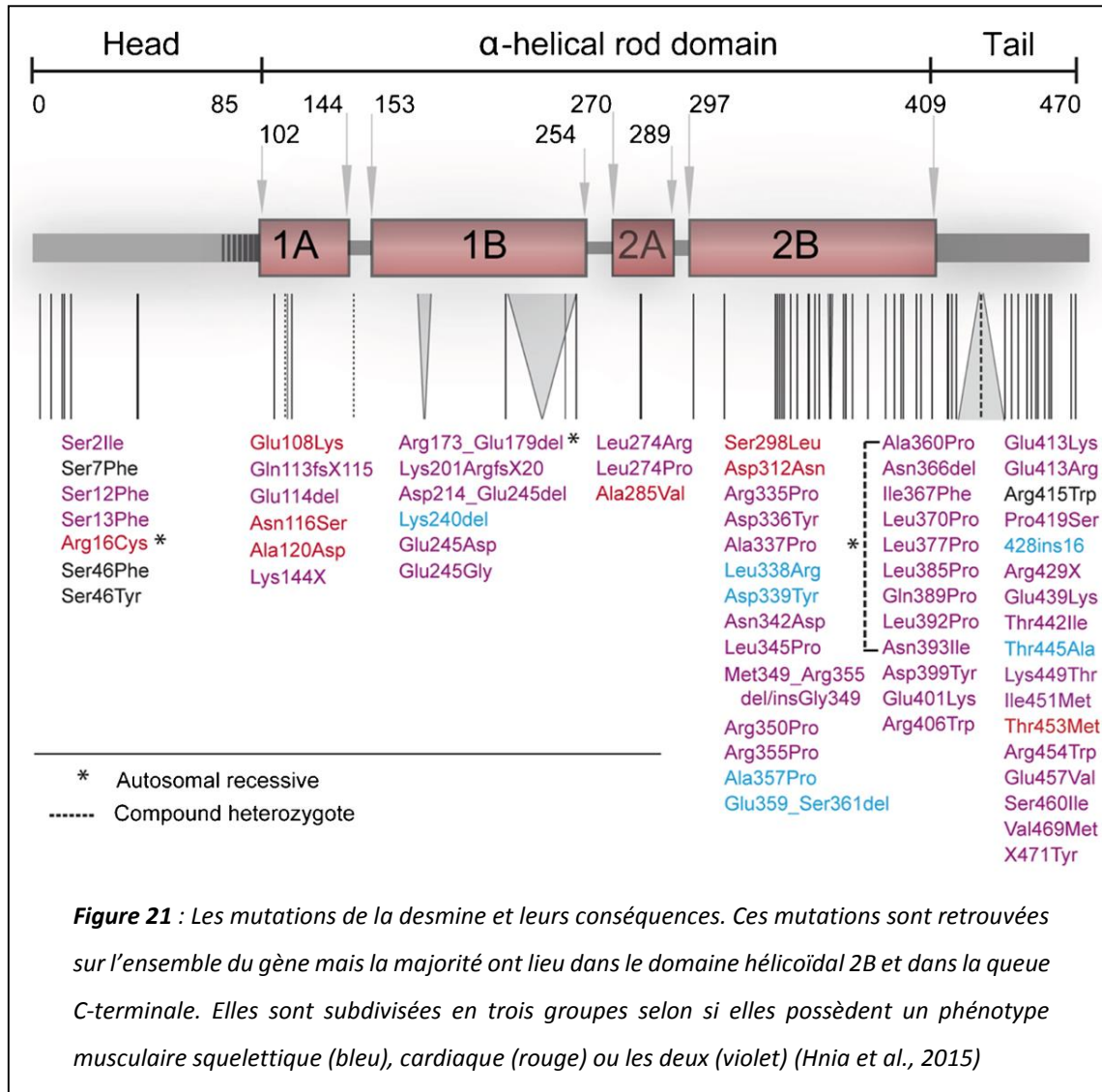
De plus, grâce à ses interactions avec de nombreuses protéines de structure telles que la nébuline, la titine ou encore l' α -actinine (Bang, Gregorio, et Labeit 2002; M. Huang et al. 2011), la desmine forme un réseau complexe et dynamique autour des stries Z. Ce réseau permet de maintenir l'alignement des myofibrilles entre elles et avec le sarcolemme par l'interaction avec les costamères mais également le placement d'organites tels que les noyaux, les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique (Paulin et al. 2004; Olivé et al. 2007; Capetanaki et al. 2007; Henderson et al. 2017) (**figure 20**). L'assemblage des myofibrilles au sarcolemme et aux mitochondries est indispensable à la transmission de la force et la mécano-transduction tout en maintenant l'intégrité des cellules musculaires. Cela permet également d'optimiser l'utilisation de l'énergie par les myofibrilles lors du mécanisme de contraction (Henderson et al. 2017; Mado et al. 2019; Agnett et al., 2022). De plus, grâce à la constitution d'un maillage tridimensionnel et l'ancrage des myofibrilles et des organelles, la desmine assure le maintien de la forme et l'architecture de la cellule, la préservation de l'intégrité musculaire, permet l'efficacité de l'activité contractile et confère une résistance envers les stress

mécaniques (Hol et Capetanaki 2017; Hnia et al. 2015; Koutakis et al. 2015; Capetanaki et al. 2015). Les FI de desmine sont également des acteurs clés de l'homéostasie et de la survie cellulaire grâce à leur implication dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que : la différenciation, les processus de réparation, l'apoptose, la signalisation intracellulaire, la mécano-transduction, le trafic vésiculaire, la biogénèse et le positionnement d'organites, l'homéostasie calcique, le métabolisme ou encore l'expression génique (Z. Li et al. 1997; Smythe et al. 2001; Carlsson et Thornell 2001; Hnia et al. 2015; Henderson et al. 2017; Tsikitis et al. 2018; Winter et al. 2019).



e) Mécanismes physiopathologiques

Des mutations de la desmine peuvent avoir des conséquences dramatiques sur l'assemblage des FI et donc sur le maintien de l'intégrité du muscle (Bär et al. 2005; 2006) et conduire à l'apparition de pathologies musculaires telles que les desminopathies généralement considérées comme des myopathies myofibrillaires particulières. Ces pathologies ont la caractéristique de présenter des phénotypes très hétérogènes où les mutations du gène de la desmine sont alors divisées en trois groupes selon le fait qu'elles induisent un phénotype spécifique pour le muscle squelettique, pour le muscle cardiaque ou bien pour les deux à la fois (**figure 21**). Ces différentes mutations provoquent de lourdes altérations qui peuvent être très variables d'un individu à l'autre telles qu'une faiblesse musculaire et/ou une insuffisance respiratoire. Elles conduisent aussi à l'apparition de pathologies parmi lesquelles des cardiomyopathies restrictives (Brodehl et al. 2019), dilatées (Brodehl et al. 2016; Fischer et al. 2021), idiopathiques (L. G. Goldfarb et al. 1998; D. Li et al. 1999) et arythmogènes (Bermúdez-Jiménez et al. 2018; Protonotarios et al. 2021), ou encore des myopathies squelettiques (Schirmer et al. 2018). Elles provoquent également une agrégation de desmine au sein du cytoplasme (Bär et al. 2004; Brodehl et al. 2012; 2019).



Une étude sur 159 patients atteints de desminopathie a montré que la majorité des patients présentaient une atteinte proximale et distale de leurs muscles squelettiques (67%) et que la moitié des patients développaient des atteintes musculaires cardiaques et squelettiques (49%) (van Spaendonck-Zwarts et al. 2011; Hnia et al. 2015). Des biopsies de patients atteints de ces pathologies présentent des fibres musculaires ayant des formes anormales (Olivé et al. 2004) avec des dépôts intracellulaires ou des corps d'inclusion (K. G. Claeys et al. 2008) et des mitochondries ayant des formes inhabituelles (Reimann et al. 2003).

f) Modèles animaux et pathologiques

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la desmine, des modèles animaux ont été développés.

➤ Modèles murins

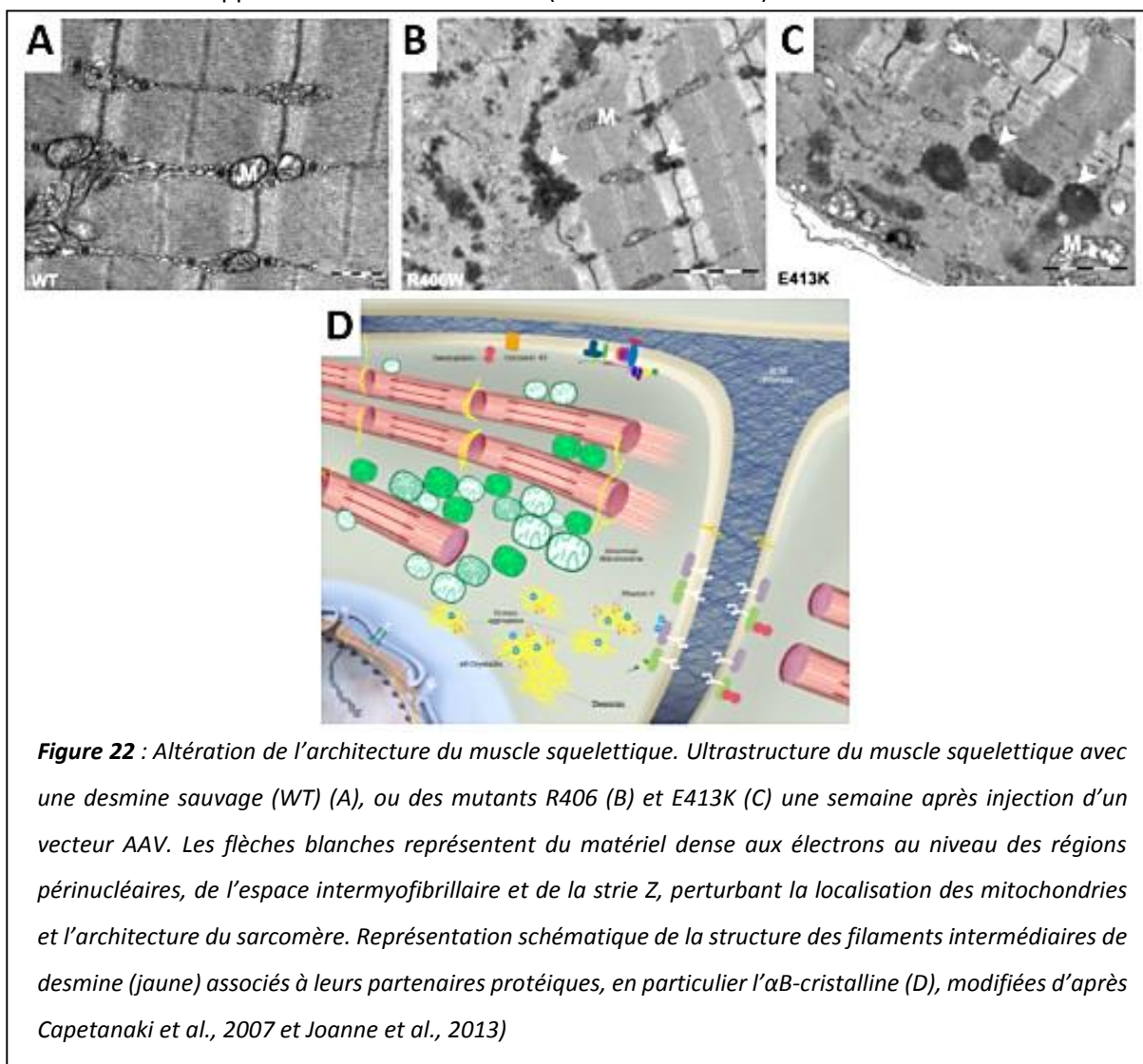
Dans un premier temps, ce fut les souris knock-out pour la desmine (*Milner et al. 1996; Z. Li et al. 1997*) qui ont permis de mettre en évidence son rôle essentiel dans la physiologie musculaire. En effet, un manque de desmine chez ces souris conduit à la perturbation de l'architecture du muscle avec de sévères anomalies des myofibrilles, caractérisée par un mauvais alignement entre elles. En conséquence, l'intégrité des myofibrilles est perdue avec une désorganisation de l'ancrage au sarcolemme, un défaut d'homéostasie calcique, des fonctions et localisations mitochondriales anormales, une apoptose et une dégénération tandis que l'endurance et la force diminuent (*Z. Li et al. 1997; Thornell et al. 1997; Y. Capetanaki et al., 1997; Paulin et al. 2004; Fountoulakis et al. 2005*). Ces résultats étaient d'autant plus conséquents dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique puisque le tissu cardiaque présentait une nécrose progressive et une calcification du myocarde (*Milner et al. 1996*). Une autre étude a montré que les cœurs murins dépourvus de desmine développaient une cardiomyopathie hypertrophique combiné à un dysfonctionnement systolique (*Milner et al. 1999*). De plus, puisque la desmine est également retrouvée dans les disques intercalaires et dans les jonctions neuromusculaire et myotendineuse des muscles cardiaque et squelettique (*Clemen et al. 2013*), ces deux éléments se trouvent perturbés lors de la régénération ou le vieillissement lorsque la desmine est mise sous silence (*Thornell et al. 1997; Agbulut et al. 2001*). Enfin, les souris knock-out présentent une faiblesse musculaire et une fatigabilité accrue, démontrant une performance moindre sur les tests d'endurance (*Haubold et al. 2003*).

➤ Modèle du poisson zèbre

Plus récemment, un nouveau modèle a été mis en place pour analyser la desmine : le poisson zèbre. Chez ce modèle, il existe deux versions du gène de la protéine : desmine a (desma) et desmine b (desmb) qui présentent respectivement 68,7% et 72% d'homologie de séquence avec la protéine humaine (*Loh et al. 2000*). Des études ont montré que la desmine était présente dans les muscles squelettiques et le myocarde en particulier à la strie Z et dans les disques intercalaires chez des embryons (*Costa et al. 2008*) et des individus adultes (*Câmara-Pereira et al. 2009*). Un KO de la desmine a chez l'embryon conduit à un phénotype particulier avec un œdème cardiaque, une déformation de la queue et des altérations dramatiques de la fréquence cardiaque (*Vogel et al. 2009*). Lors d'un KO des deux versions du gène (desmine a et b) au stade larvaire, il existe un problème d'espacement entre les filaments. Cela induit une diminution des propriétés mécaniques des muscles squelettiques bien plus importante que lors d'un knock-out de la desmine a seule (*M. Li et al. 2013*). Ces nouveaux modèles sont en accord avec les modèles murins qui supportaient un rôle très important de la desmine pour le maintien de l'intégrité du muscle cardiaque et squelettique.

➤ Modèles de myopathies ou cardiomyopathies

Le premier modèle de myopathie a été créé chez le hamster en 1996 (Raats *et al.* 1996) et possédait de la desmine uniquement dans quelques cellules musculaires squelettiques et très peu dans le cœur. Ce modèle entraînait une désorganisation des tubules transverses accolés au réticulum sarcoplasmique mais sans altération importante de l'organisation sarcomérique. Puis, dans un autre modèle, on pouvait observer un défaut du métabolisme mitochondrial qui entraînait une diminution de la force musculaire, un épaissement de la paroi ventriculaire gauche et une augmentation de la fibrose cardiaque. En revanche, aucun agrégat de desmine ou aucune désorganisation des myofibrilles n'étaient observés (Kostareva *et al.* 2008). Plus récemment, deux modèles de desminopathies ont été mis en place grâce aux adénovirus conduisant à l'accumulation de la desmine autour du noyau ou sous le sarcolemme. Ces amas de desmine entraînaient une perturbation de l'architecture des fibres musculaires, des changements de localisation des noyaux et des mitochondries ainsi qu'une altération de l'alignement des stries Z (**figure 22**). Dans les deux cas, les muscles touchés présentaient des troubles de développement de force maximale (Joanne *et al.* 2013).

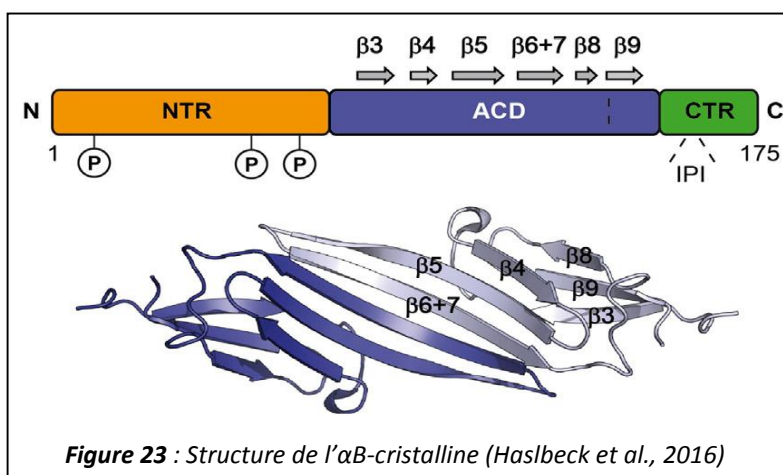


Chez l'Homme, une insuffisance cardiaque entraîne une augmentation de l'expression de la desmine. Ceci pourrait être un mécanisme de défense et de protection afin de maintenir l'alignement structural des sarcomères (Z. Li *et al.* 1997; Heling *et al.* 2000). Puisque l'apparition d'agrégats est un phénotype commun à l'ensemble des desminopathies et dans une plus large mesure aux myopathies myofibrillaires, prendre en charge ces agrégats délétères seraient un bon moyen de lutter contre la progression des pathologies. Pour cela, il serait intéressant de trouver des drogues ou des molécules capables de prévenir la formation de ces agrégats. Dans ce sens, la modulation de l'expression ou de l'activité des protéines chaperonnes qui modulent la formation des FI de desmine pourrait être une stratégie prometteuse pour ces pathologies (Hnia *et al.* 2015).

C) Les protéines chaperonnes : l' α B-cristalline

Tout comme la desmine, les protéines chaperonnes ou protéines de choc thermique (HSP : heat shock protein) ont un grand rôle à jouer dans le maintien de l'architecture de la cellule musculaire. En effet, elles permettent de maintenir la solubilité des protéines tout en luttant contre leur agrégation lorsque celles-ci sont mal conformées, permettant ainsi le maintien de la protéostasie ou homéostasie protéique. L'un des principes fondamentaux de la protéostasie étant la préservation de l'intégrité du protéome (Ciryam *et al.* 2013), ces protéines font alors partie de ce qu'on appelle le système du contrôle qualité des protéines (PQC : protein quality control) (Reinle, Mogk, et Bukau 2022).

La première protéine à intervenir lorsque la protéostasie est perturbée est l' α B-cristalline ou HSPB5. Codée par le gène *CRYAB*, cette protéine fait partie de cette grande famille et est considérée comme une petite protéine de choc thermique (sHSP : small Heat Shock Protein) puisqu'elle est composée de 175 acides aminés pour 20,2 kDa. Ces sHSP ont la particularité de former d'énormes complexes homo ou hétéro-oligomériques présentant entre 9 et 48 sous-unités (Jiao *et al.* 2005; Mishra *et al.* 2018). Ayant une structure commune, ces protéines présentent un domaine central très conservé au sein de la famille des petites protéines de choc thermique et au cours de l'évolution, compris entre deux parties C et N-terminales plus variables (Chernova *et al.* 2020). De manière plus spécifique, le domaine N-terminal de l' α B-cristalline est la cible de



nombreuses modifications et est composé de deux courtes hélices et d'un petit feuillet β antiparallèle reliés par une longue boucle et mesurant le tiers de la taille totale de la protéine. Ce domaine N-terminal est très flexible. Le domaine central ACD (α -crystallin core domain), portant l'activité chaperonne, est composé de sept feuillets béta. Enfin, le domaine C-terminal, composé d'une vingtaine d'acides aminés, est crucial dans la régulation de cette protéine notamment grâce à la séquence IxI qui sert d'ancrage pour la formation d'oligomères et inhibe le domaine ACD (Haslbeck et al. 2016; Clark 2016) et permet donc l'activité de la chaperonne (Chernova et al. 2020) (figure 23).

Outre son rôle de préservation de la protéostasie, elle joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire puisqu'elle est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la stabilisation du cytosquelette, l'intégrité cellulaire, l'apoptose, l'autophagie, la différenciation, la fonction mitochondriale ou encore la prise en charge d'agrégats protéiques (Boelens 2014; Bakthisaran, Tangirala, et Rao 2015). Au sein du muscle squelettique, cette protéine est essentielle au maintien de la structure sarcomérique (Brady et al. 2001). En effet, elle est présente au niveau de la strie Z, et a une très forte interaction avec la desmine dont elle est le chaperon moléculaire (Capetanaki et al. 2015), lui permettant d'assister et de moduler la polymérisation des FI en les stabilisant et en prévenant leur agrégation (Nicholl et Quinlan 1994; Costa et al. 2004). De manière intéressante, il a été démontré que des mutations de l' α B-cristalline (Vicart et al. 1998) ou des FI de desmine (Goldfarb et al. 1998) possèdent un phénotype commun et conduisent à l'apparition de pathologies telles que les cardiomyopathies. En effet, R120G, la première mutation décrite de l' α B-cristalline supprime son activité de chaperonne et diminue son affinité pour la desmine conduisant à l'agrégation des FI et des protéines associées (Perng et al. 2004; Andley et al. 2011; Perng, Huang, et Quinlan 2016). L'interaction entre la chaperonne et les FI de desmine aurait donc un important rôle cytoprotecteur pour la physiologie des muscles striés (Capetanaki et al. 2015). L'équipe

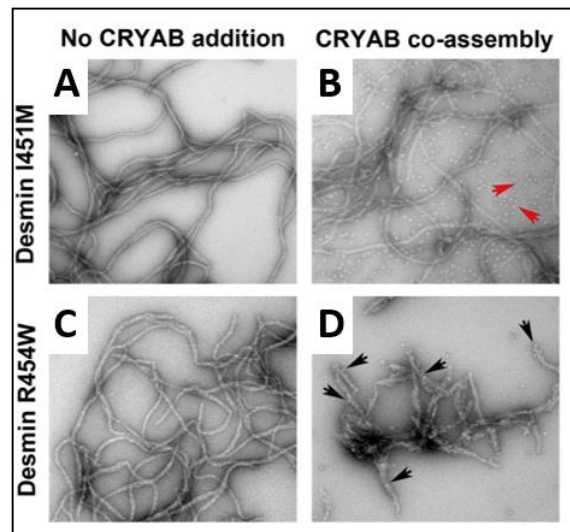


Figure 24 : L' α B-cristalline détecte les mutants de la desmine selon les caractéristiques de la surface des FI. Le mutant I451M présente une topologie de FI similaire au contrôle (i) et l' α B-cristalline se lie moins à ce mutant (flèches rouges) (ii). A l'inverse, le mutant R454W forme des filaments plus larges et lâches (iv) et l' α B-cristalline s'y fixe plus facilement (flèches noires) (v) (Sharma et al., 2017)

de Sharma et collaborateurs ont démontré que cette interaction s'effectuait en particulier au niveau du domaine C-terminal de la desmine (Sharma et al. 2017). En effet, lorsque la desmine présentait une

mutation de ce domaine (R454W), les filaments formés étaient plus lâches et plus larges que chez le contrôle. De plus, la chaperonne présentait une plus forte interaction pour les filaments (**figure 24**), indiquant que l' α B-cristalline est capable de reconnaître la surface du mutant comme étant anormale. La desmine utiliserait alors la liaison de l' α B-cristalline à son domaine C-terminal pendant son processus d'assemblage pour influencer la topologie des filaments ainsi formés mais également l'interaction avec ses autres partenaires protéiques sarcomériques (*Sharma et al. 2017*). Il semblerait également que le degré d'interaction de la chaperonne avec la desmine serait différent selon les différences de surface des filaments.

Ainsi, il a été démontré qu'une altération telle qu'une mutation des protéines impliquées dans la structuration sarcomérique va s'accompagner d'une désorganisation du sarcomère associée à une diminution de la génération de la force (**figure 25**). En revanche, ce phénotype possédera des degrés et des conséquences différentes, et sera responsable de pathologies diverses et variées telles que des dystrophies musculaires, des neuropathies, des cardiomyopathies ou des myopathies myofibrillaires (*Knöll et al., 2011*). Ces dernières, bien que multifactorielles, sont souvent la conséquence de mutations de la desmine et/ou de l' α B-cristalline (*Schröder et Schoser 2009; Olivé et al. 2011; Selcen 2011; Kristl G. Claeys et Fardeau 2013*). Afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies neuromusculaires, pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun traitement disponible, il est essentiel d'étudier les mécanismes sous-jacents pouvant intervenir dans les mécanismes d'agrégation protéiques, de désorganisation des sarcomères observés dans ces pathologies, en particulier les changements de modifications post-traductionnelles.

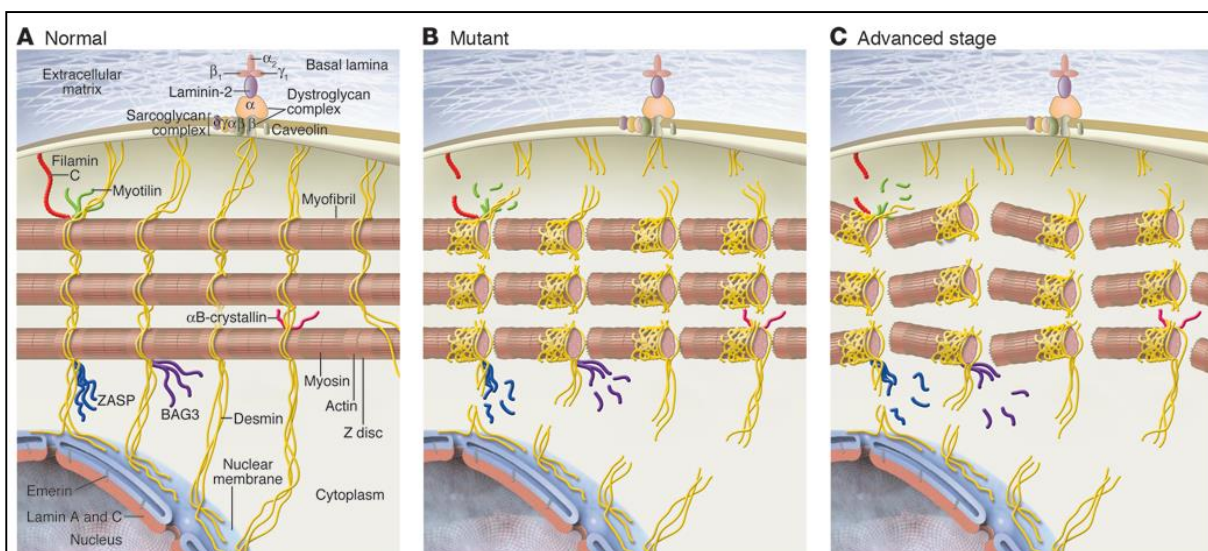


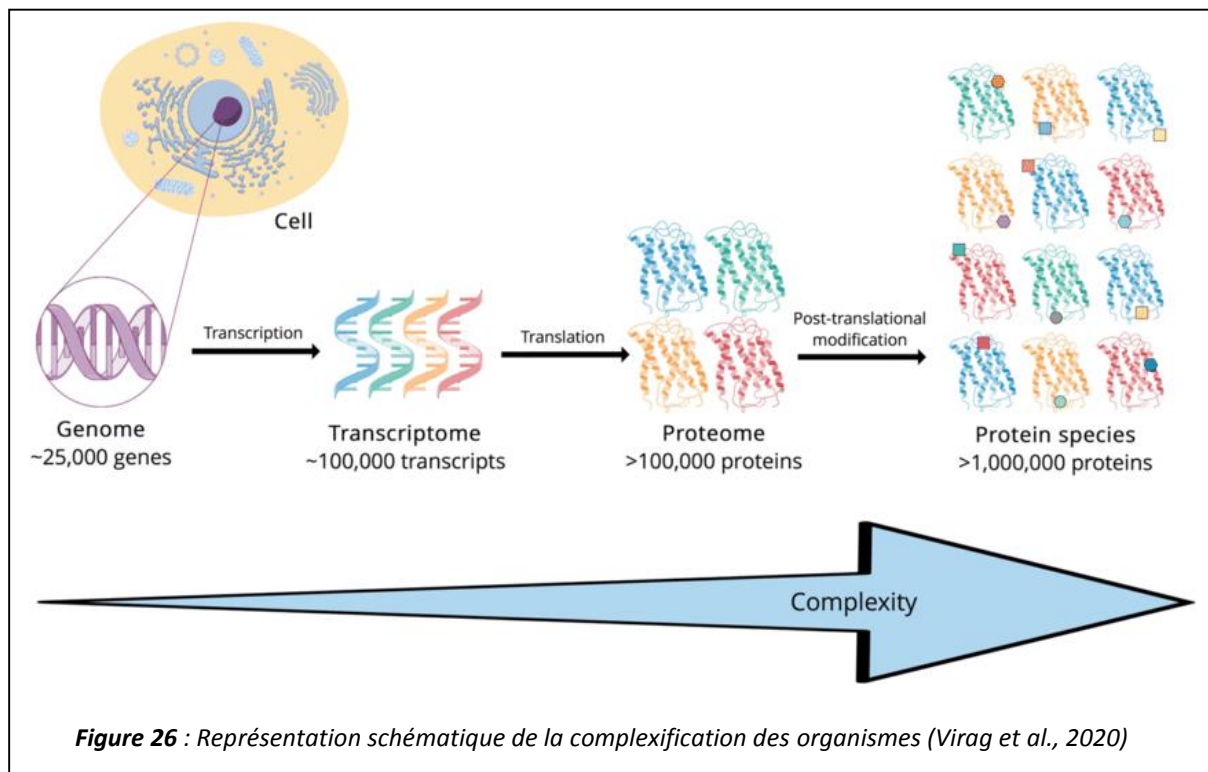
Figure 25 : Conséquences dramatiques d'une mutation d'une protéine de structure du sarcomère. Lorsque les protéines de structure sont fonctionnelles, les myofibrilles sont parfaitement alignées entre elles (A). Lors d'une mutation de l'une de ces protéines, il y a une perte du lien entre les myofibrilles et le sarcolemme (B) qui peut s'accroître et provoquer une désorganisation des myofibrilles (C) (*Gldfarb et al., 2009*)

INTRODUCTION

Partie 2 : Les modifications post-traductionnelles

Avant-propos

Au cours de l'évolution, les espèces ont dû s'adapter à leur environnement pour survivre. Cette adaptation passe en partie par des changements de phénotype des individus ou des populations. Afin d'obtenir ces modifications, il existe de nombreuses étapes sous-jacentes telles que le génome, le transcriptome, le protéome et le métabolome, qui vont permettre de complexifier et diversifier les organismes (Sun et Hu 2016) (**figure 26**). Ces différentes étapes requièrent chacune des mécanismes de régulation très précis. En effet, le génome, correspondant à l'ensemble du matériel génétique contenu au sein de l'ADN, est différent d'une espèce à l'autre. Chez l'Homme, le séquençage complet de ce génome a été réalisé en 2003 et compte environ 30 000 gènes (International Human Genome Project, (Birney 2021)). Cet ADN doit ensuite être converti en ARN par le biais de la transcription afin d'établir le transcriptome. Ce dernier va servir de plan afin de synthétiser les différentes protéines de l'organisme lors de la traduction et conduire à un protéome bien plus complexe que le génome puisque chez l'Homme, on dénombre plus d'un million de protéines différentes. Enfin, il est possible d'étudier certaines petites molécules qui régulent des mécanismes de l'organisme et qui font partie du phénotype de chaque individu : c'est ce qu'on appelle la métabolomique. Chaque niveau étant plus élaboré que celui qui le précède, les phénotypes sont donc bien plus complexes et variés que l'expression génique d'une espèce donnée (**figure 26**).



Le protéome n'échappe pas à cette hiérarchisation et cette diversification. En effet, pour un gène donné, il peut y avoir production de différentes protéines, d'où le nombre bien plus important de protéines que de gènes chez l'Homme. Outre l'épissage alternatif des ARNm, conduisant à l'expression d'isoformes différentes, ces protéines peuvent également subir ce qu'on appelle des modifications post-traductionnelles (MPT). Ce sont des mécanismes biochimiques réversibles ou irréversibles par lesquels certains résidus d'acides aminés qui composent la séquence d'une protéine peuvent être modifiés par la liaison covalente d'un groupement chimique (glucide, lipide, sulfate, phosphate...) ou même d'une protéine (Walsh *et al.*, 2005). Alors que certaines MPT surviennent pendant ou dès la fin de la traduction, d'autres peuvent se produire lorsque la protéine possède sa structure et sa localisation finales. Ces modifications sont des régulateurs forts des propriétés des protéines puisqu'elles peuvent modifier leur localisation cellulaire, leur assemblage et leur conformation, et donc moduler leurs fonctions et les interactions avec leurs partenaires protéiques (Beltrao *et al.* 2013). En effet, les MPT interviennent le plus souvent au niveau de sites et domaines très conservés au cours de l'évolution qui sont pour la plupart des domaines fonctionnels des protéines cibles, comme les domaines impliqués dans les interactions avec leurs partenaires protéiques par exemple (Minguez *et al.* 2012; Lu *et al.* 2013).

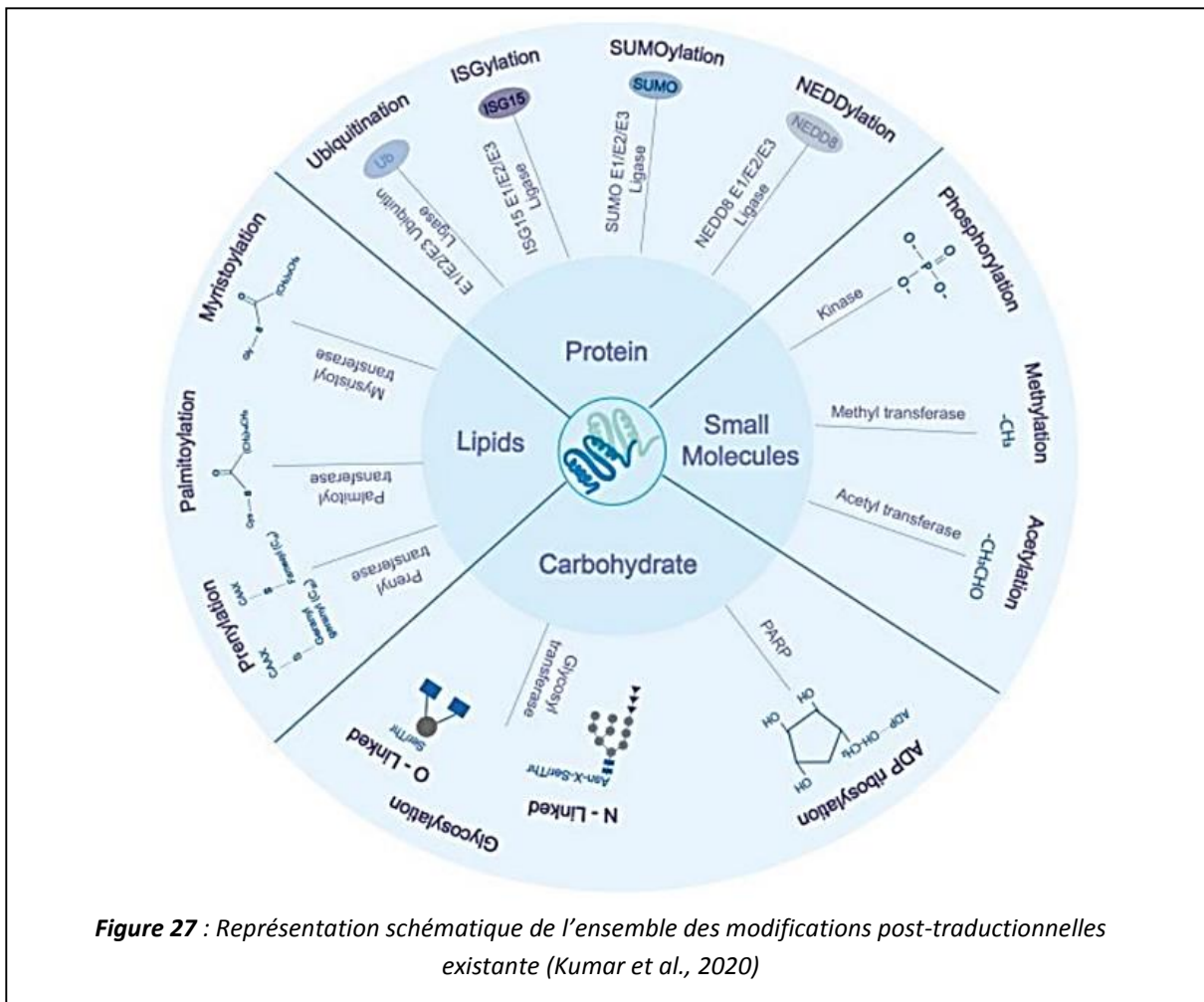


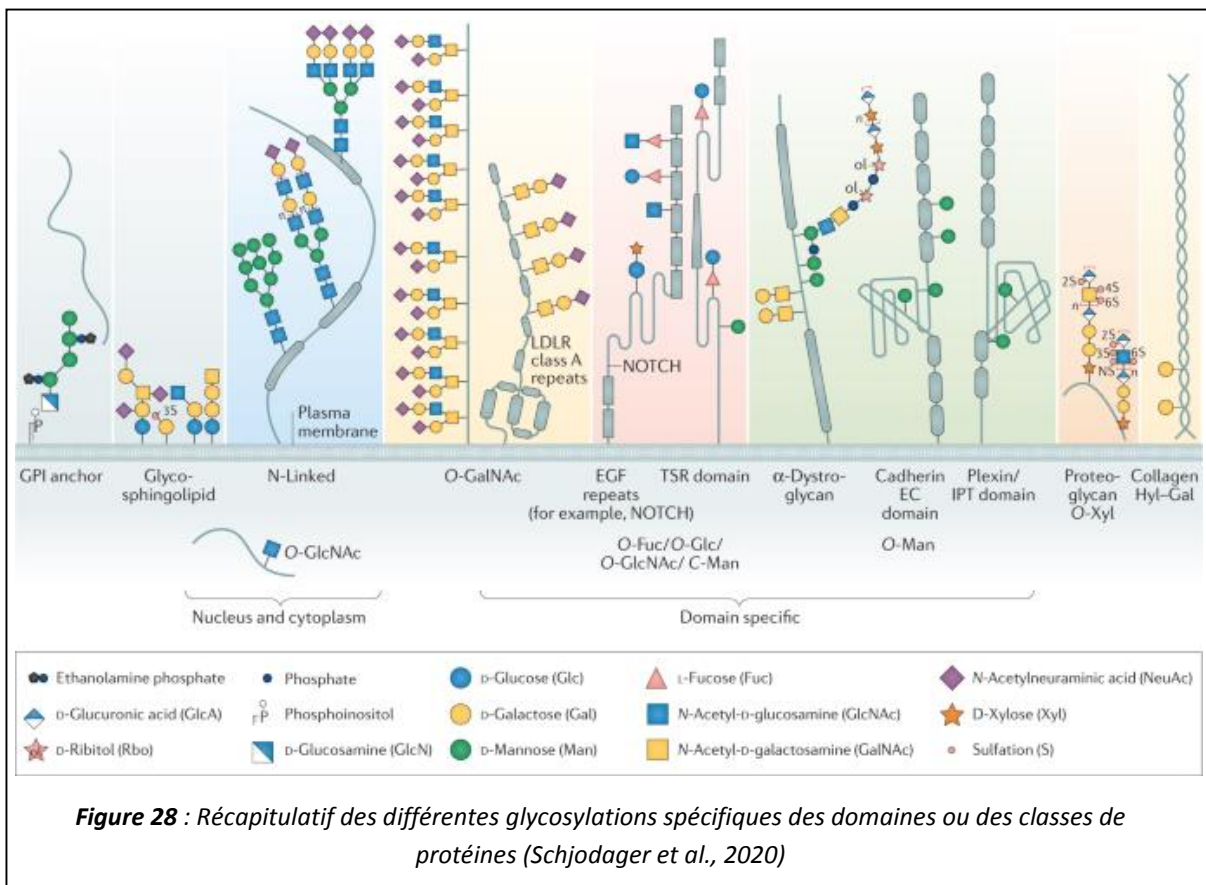
Figure 27 : Représentation schématique de l'ensemble des modifications post-traductionnelles existante (Kumar *et al.*, 2020)

Il existe à ce jour une centaine de MPT connues mais les plus couramment étudiées sont la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, la glycosylation, l'ubiquitination, etc (Zhou et Deiters 2021) (**figure 27**). Très dynamiques, ces différentes MPT seraient capables de présenter certains degrés d'interaction les unes avec les autres, et n'interviendraient pas de la même manière sur une protéine dans le temps et dans l'espace. Il existerait alors un MPT-code pour chaque protéine selon son état ou l'environnement dans lequel elle se trouve afin que la cellule puisse le lire et le traduire dans le but de réguler des processus biologiques complexes (Chen et al. 2018). Les enzymes responsables de ces MPT réguleraient alors directement la fonction des protéines (activation ou inhibition) ou indirectement, par un changement de localisation subcellulaire ou encore la formation de complexes protéiques et la transduction des signaux biologiques (Liu et al. 2022). Malgré un nombre d'études croissant à ce sujet ces dernières années, ces mécanismes de régulation sont encore mal compris de par leur complexité, et notamment par le fait qu'une protéine peut porter plusieurs MPT, chacune pouvant avoir un effet propre sur la fonction de la protéine (Prabakaran et al. 2012). Ici, nous nous sommes plus précisément intéressés à la phosphorylation et la O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation (O-GlcNAcylation), une glycosylation particulière.

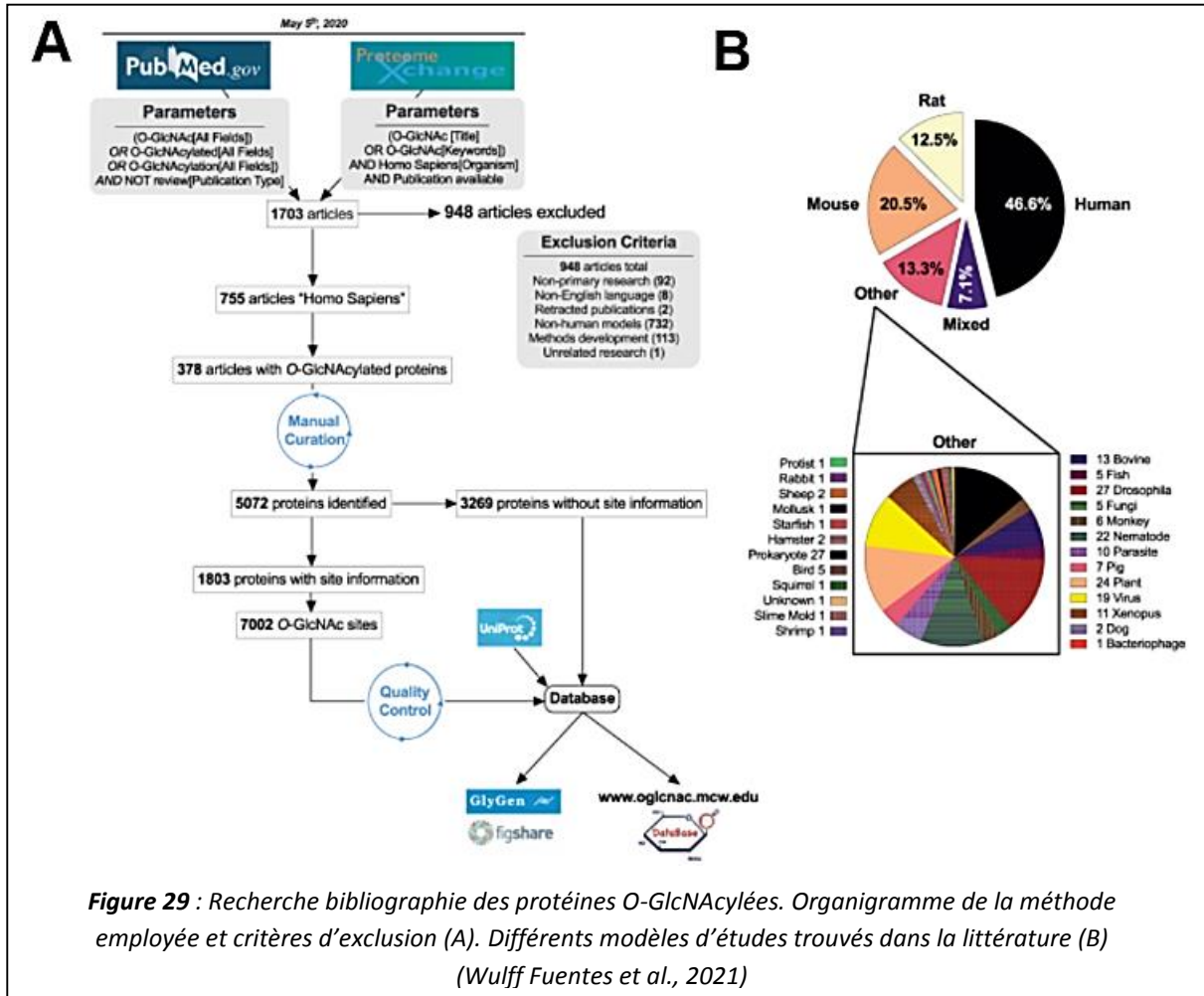
I) La O-GlcNAcylation

A) La O-GlcNAcylation : une glycosylation atypique

Les glycosylations sont les MPT les plus abondantes et les plus diverses chez les cellules eucaryotes. Elles correspondent à l'ajout d'oligosaccharides sur certaines protéines lors de leur synthèse permettant la complexification du protéome (Schjoldager et al. 2020). Ces MPT sont très importantes puisqu'elles peuvent moduler les interactions cellule-cellule ou cellule-microorganisme, avoir un rôle structural ou encore participer à la biodiversité. Comme le montre la **figure 28**, il existe de nombreux types de glycosylation, qui vont différer selon les sucres ajoutés au niveau des protéines, modulant ainsi leurs caractéristiques et leurs fonctions (Reily et al. 2019). La spécificité de la glycosylation dépend également de la façon dont les glycanes sont attachés aux protéines. Les liaisons les plus connues étant les N-glycanes liés à l'asparagine, les O-glycanes liés au groupement hydroxyle des sérines ou thréonines ou bien la C-mannosylation liée au tryptophane des protéines. Notre intérêt s'est particulièrement porté sur l'une de ces dernières, la O-N-acétyl-β-D-glucosaminylation, dite O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique existant chez de nombreux organismes et très conservée au cours de l'évolution (Itkonen, Loda, et Mills 2021).

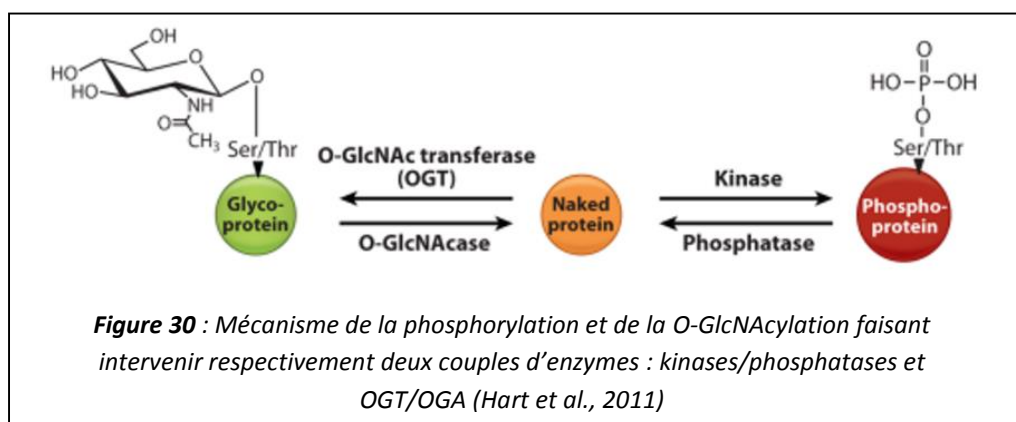


Découverte en 1984 par l'équipe de Gérald W. Hart (*Torres et Hart 1984*), la O-GlcNAcylation suscite de plus en plus l'intérêt des chercheurs du monde entier. En effet, environ 5 000 protéines et plus de 7 000 sites O-GlcNAcylés ont été identifiés au cours des trente dernières années (*Wulff-Fuentes et al. 2021*) (**figure 29**).



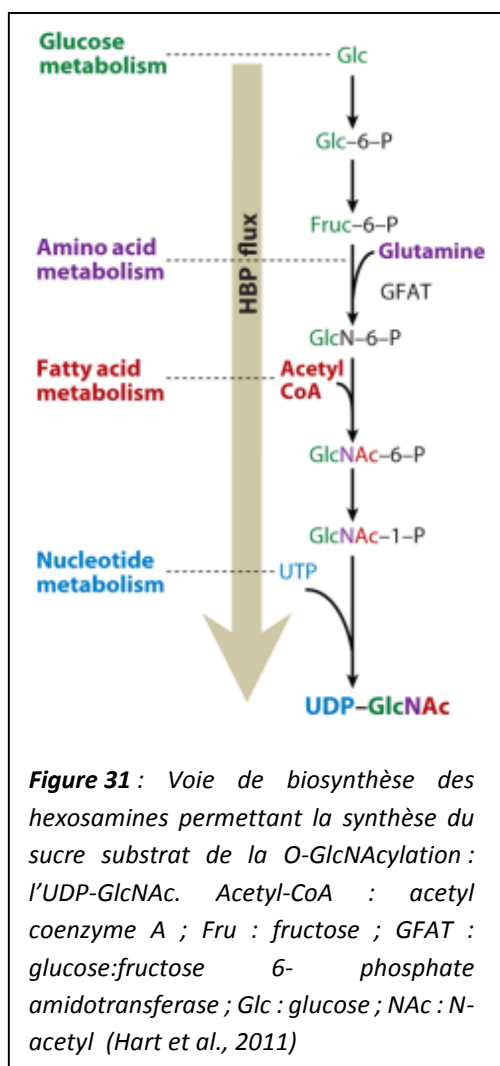
A l'inverse des glycosylations « classiques » correspondant à l'ajout de structures glycaniques complexes sur les protéines, la O-GlcNAcylation va correspondre au transfert d'un unique monosaccharide sur les résidus sérine et thréonine des protéines (*Chatham, Zhang, et Wende 2021*). Ce monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine, provient d'un unique donneur, l'UDP-GlcNAc, produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines (*J. A. Hanover et al. 1999*). Se rapprochant plus de la phosphorylation que des autres glycosylations, la O-GlcNAcylation peut modifier des protéines nucléaires, cytosoliques et mitochondriales. De plus, elle présente une dynamique commune et est réversible puisque ce monosaccharide particulier peut être ajouté ou enlevé grâce à un mécanisme particulier (*Yang et Qian 2017*). Contrairement à la phosphorylation qui fait intervenir de nombreuses kinases et phosphatases, le mécanisme de la O-GlcNAcylation met en jeu un unique couple d'enzyme : l'uridine diphospho-N-acétyl-glucosaminyltransférase (O-GlcNAc Transférase ou OGT) et la β -N-

acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase (OGA). Ces deux enzymes permettent respectivement d'ajouter et d'éliminer le sucre sur les protéines (Haltiwanger et al., 1990; Haltiwanger, Blomberg, et Hart 1992; Dong et Hart 1994; Gao et al. 2001) (**figure 30**).



B) La voie de biosynthèse des hexosamines

Afin que les enzymes spécifiques au processus de la O-GlcNAcylation puissent parfaitement jouer leur rôle, il est nécessaire qu'elles soient en présence de N-acétyl-D-glucosamine, unique substrat de l'OGT. Ce dernier provient exclusivement de la biosynthèse des hexosamines. Cette voie nécessite la présence d'enzymes spécifiques telle que la glucose fructose 6-phosphate amidotransférase (GFAT) qui en est le facteur limitant. Elle est également régulée par de nombreux mécanismes et est en lien avec le métabolisme des glucides, des acides aminés, des acides gras et enfin des nucléotides. En effet, afin de produire l'UDP-GlcNAc, certains éléments tels que le glucose, la glutamine, l'acétyl-coenzyme A, l'uridine triphosphate (UTP) et l'adénosine triphosphate (ATP) sont indispensables (Gerald W. Hart et al. 2011; Coussement et al. 2020) (**figure 31**). Le flux de glucose va donc être un des facteurs limitants de la production du substrat de la O-GlcNAcylation puisque seul 2 à 3% du glucose intracellulaire va passer par cette voie (Hanover et al., 2010). De plus, seulement 3 à 5% de fructose 6-phosphate va être converti par la GFAT en présence de

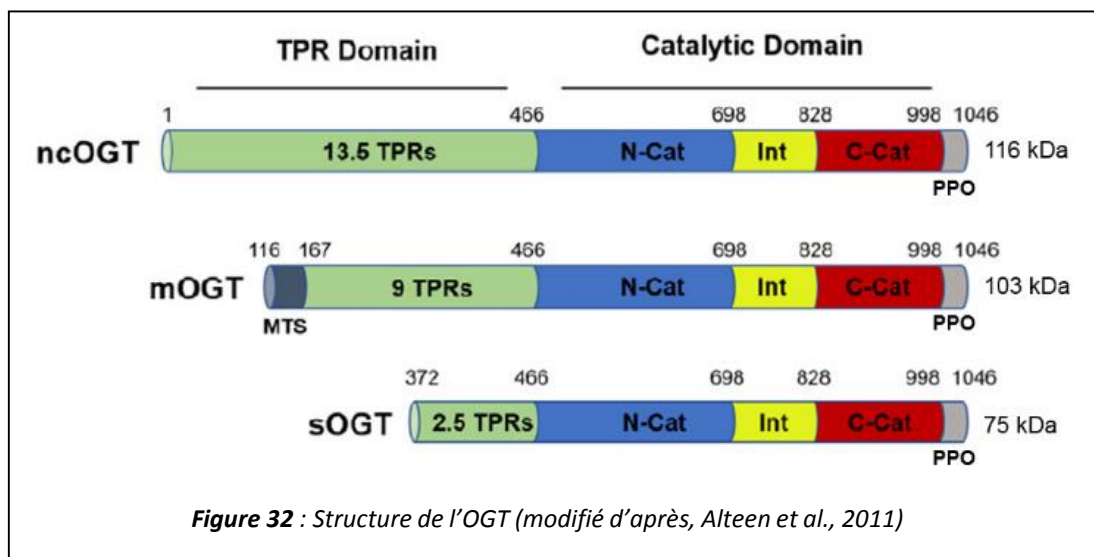


glutamine pour former la glucosamine-6-phosphate (Liu et al. 2022) (**figure 31**). Celle-ci sera convertie en glucosamine-1-phosphate, puis couplée à l'UTP pour former l'UDP-GlcNAc. Dernière étape de cette voie de biosynthèse, l'UDP-GlcNAc servira de substrat à l'OGT pour conduire à la O-GlcNAcylation.

C) Les enzymes impliquées : OGT et OGA

a) OGT

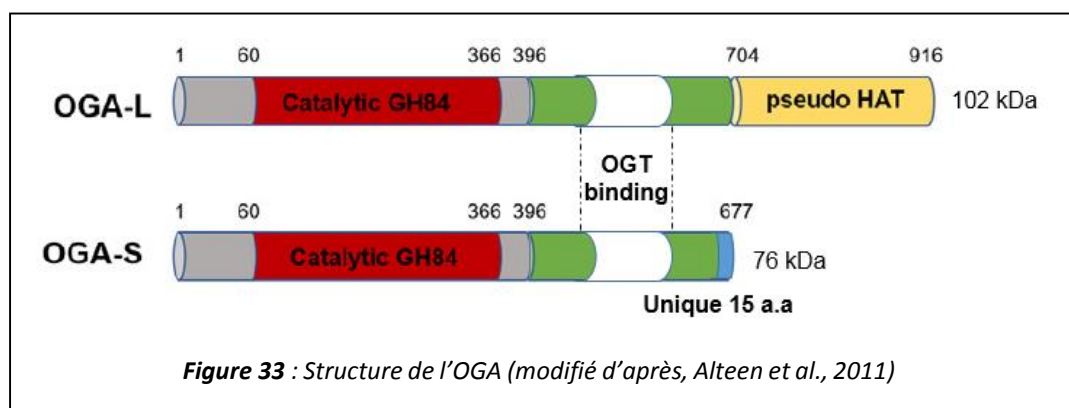
L'OGT est une enzyme ayant une très grande homologie de séquence entre les espèces (Hartweck, Scott, et Olszewski 2002). Codée par le gène *OGT* présent sur le chromosome X, elle fait partie de la superfamille des glycosyltransférases GT-B (Lairson et al. 2008) qui présentent deux régions très conservées (Kreppel et Hart 1999). La région TPR (tetratricopeptide repeat region), localisée en N-terminal de l'enzyme, est une région comprenant un motif répété de 34 acides aminés disposés de manière hélicoïdale et intervenant souvent dans les interactions protéine – protéine (Cheung et al. 2008; Allan et Ratajczak 2011; Ramirez et al. 2021). Ces motifs particuliers permettent la régulation de l'activité de l'enzyme en interagissant avec des protéines régulatrices, conférant à l'OGT sa spécificité de substrat (Jínek et al. 2004) La seconde région est un domaine catalytique en C-terminal qui contient un domaine PPO (phosphoinositide binding domain) qui permet à l'OGT de s'associer à la membrane cellulaire (Yang et al. 2008; Lazarus et al. 2011) (**figure 32**). En fonction du nombre de motifs TPR en N-terminal, trois isoformes peuvent être définies : ncOGT (OGT nucléocytoplasmique) de 116 kDa avec 13,5 TPR, mOGT (OGT mitochondrial) de 103 kDa avec 9,5 TPR et enfin sOGT (OGT court) de 75 kDa avec 2,5 TPR (Gloster et Vocadlo 2010).



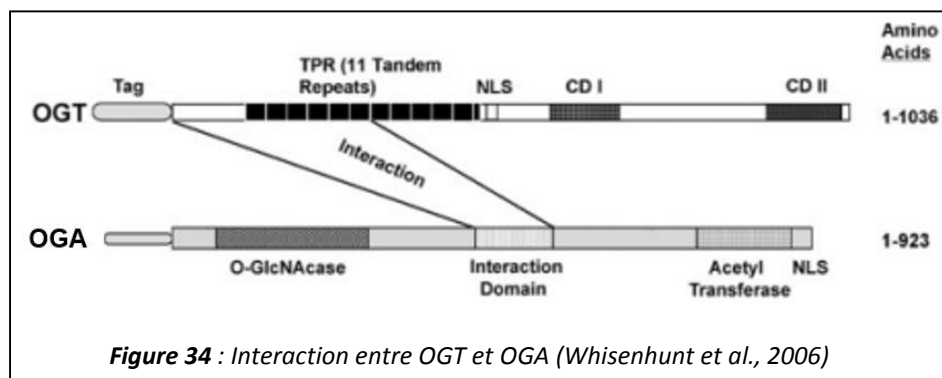
L'OGT peut être régulée de différentes manières. Comme énoncé précédemment, son activité peut être modifiée par des interactions avec différentes protéines partenaires. Elle est également régulée par la phosphorylation. Celle-ci peut être phosphorylée par GSK3 (Kaasik et al. 2013), AMPK (Bullen et al. 2014) ainsi que CamKII (Ruan et al. 2017) ou par des protéines de la voie de l'insuline (Chatham et al., 2021). De plus, il a également été démontré qu'une mutation de sites de phosphorylation de l'OGT (thréonine 12 ou sérine 56) modifie son interaction avec plus de 500 protéines partenaires modulant ainsi sa spécificité pour son substrat (Cheung et al. 2008; Liu et al. 2019). Enfin, l'UDP-GlcNAc étant son seul substrat, l'OGT va également être régulée par les flux de nutriments des différentes voies métaboliques cellulaires utilisées dans la voie de biosynthèse des hexosamines (Haltiwanger et al., 1992).

b) OGA

Contrairement à l'OGT qui permet d'ajouter le motif GlcNAc sur les protéines, l'OGA permet de l'hydrolyser. Très conservée chez les espèces eucaryotes, en particulier chez les mammifères, elle est cependant absente chez la majorité des procaryotes et des levures (Wells et al. 2002; Kim 2011; He et al., 2020; Song et al., 2021). Initialement identifiée comme étant la MGEA5 (meningioma-expressed antigen 5), l'enzyme est codée par le gène *MGEA5* situé sur le chromosome 10 en particulier sur le locus 10q24.1. Ce locus a un lien avec le diabète de type 1 et l'obésité (Bond et Hanover 2015) mais également avec le diabète de type 2 (Lehman et al. 2005). C'est une enzyme composée de plusieurs régions dont un domaine N-terminal similaire à ceux de la famille des glycosylhydrolases 84 (GH84), un domaine central en hélice peu conservé, une région HAT (histone acétyltransférase) en C-terminal importante pour la fonction de déglycosylation et de plusieurs régions de faible complexité (Gao et al. 2001) (figure 33). Cette forme longue et active de 102 kDa est préférentiellement retrouvée dans le cytoplasme (ncOGA). Il existe également une isoforme courte (sOGA) de 76 kDa dépourvue du domaine HAT, moins abondante et moins active que la forme non tronquée ; on la trouve plus spécifiquement dans le noyau (Kim et al. 2006; Gloster et Voadlo 2010). Cette dernière possède une courte séquence de 15 acides aminés dans sa partie C-terminale (Bond et Hanover 2015).

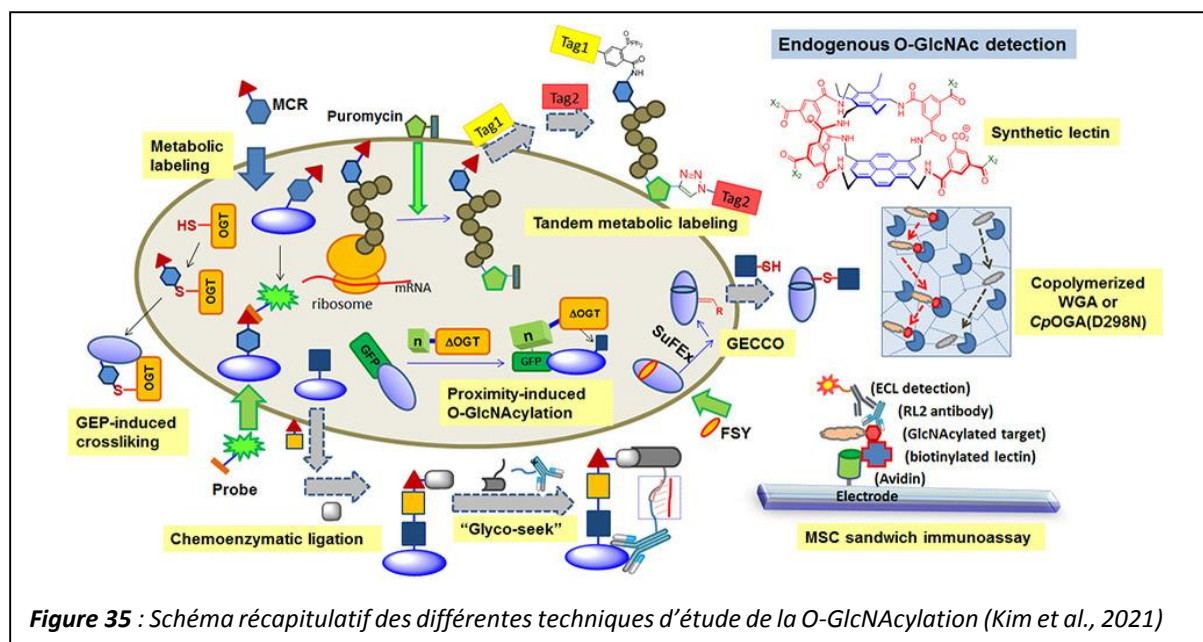


L'OGA est capable de reconnaître une large gamme de séquences peptidiques afin d'hydrolyser le motif GlcNAc de nombreuses protéines (Schimpl et al. 2010). De plus, tout comme l'OGT, l'OGA est également affectée par des MPT telle que la phosphorylation, en particulier au niveau de ses domaines hydrolase et HAT (Wu et al., 2017) ; cependant, ces modifications sont encore mal comprises. De plus, le site d'O-GlcNAcylation de l'OGA sur sa sérine 405 se trouve dans une région de liaison avec l'OGT (figure 34). Cela suggère que l'OGA puisse interagir avec l'OGT sous forme de complexe pour être active : c'est ce qu'on appelle l'O-GlcNAczyme (Whisenhunt et al. 2006; Balsollier et al., 2021). Enfin, son activité peut être modulée en fonction de son expression, sa localisation ou sa conformation (Nagel et Ball 2014).



D) Les techniques d'études de la O-GlcNAcylation

De nouvelles techniques et outils ont émergés ces dernières années, rendant l'étude de la O-GlcNAcylation plus aisée (pour revue Banerjee et al, 2013; Mueller et al. 2020) (figure 35).

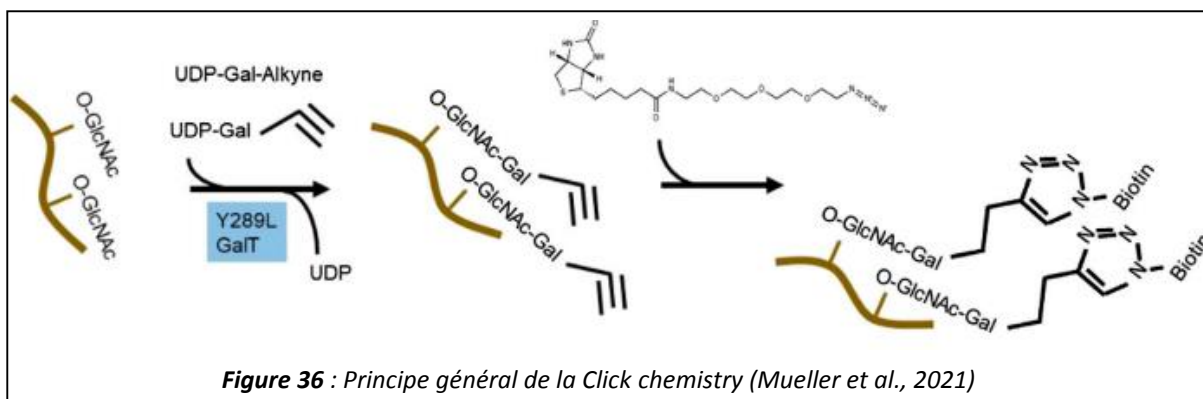


a) Anticorps et lectines

A l'origine, la présence de la O-GlcNAcylation était détectée par des lectines, protéines capables de fixer des sucres avec différentes propriétés, en particulier la sWGA (succinylated Wheat Germ Agglutinin) (*Hanover et al. 1987; Zachara 2009*). L'utilisation de ces lectines permettait donc de purifier un échantillon protéique par chromatographie d'affinité ou par la technique de LeMBA (Lectin Magnetic Beads Arrays) qui permet de coupler des billes magnétiques sur ces lectines. Puis, de nouvelles méthodes ont émergé grâce au développement d'anticorps capables de reconnaître le motif O-GlcNAc quel que soit l'identité et la séquence de la protéine subissant la modification (*Ma et Hart 2014; Tashima et Stanley 2014*). Parmi ces anticorps, les plus connus sont le CTD110.6 et RL2 (*Snow et al., 1987; Comer et al. 2001*). En plus de permettre la purification par immunoprécipitation, l'élaboration de ces anticorps a permis de détecter les protéines O-GlcNAcylées par western-blot, par ELISA ou même encore au sein de tissu par immunofluorescence (*Vercoutter-Edouart et al. 2015*).

b) Click-chemistry

Afin de détecter la présence de la O-GlcNAcylation, les anciennes approches faisaient appel à l'utilisation de sucre radioactif incorporés au niveau des protéines mais cette méthode était délicate et longue. Depuis une vingtaine d'années, cette technique a évolué au profit de la click chemistry. Cette approche consiste à l'utilisation d'une galactosyltransférase modifiée capable de greffer un dérivé du galactose (GalNAz ou céto galactose) sur des fragments GlcNAc (*Khidekel et al. 2004*). Il s'en suit l'addition chimique d'un groupement polyéthylèneglycol (PEG) ou d'une biotine permettant la purification et la détection des protéines et/ou peptides marqués par chromatographie d'affinité avidine/streptavidine (*Rexach et al. 2010; Vercoutter-Edouart et al. 2015*) (**figure 36**). Des méthodes alternatives existent et consistent à un marquage métabolique de cellules en culture par le N-azidoacétylglucosamine per-O-acétylée (Ac4GlcNAz) ou de le N-alkyne-acétylglucosamine per-O-acétylée (Ac4GlcNAk) (*Kim 2011; Hahne et al. 2013*).



c) Libération des glycanes

- Chimique : la BEMAD (Beta Elimination followed by Michael Addition with Dithiothreitol)

Cette méthode est utilisée directement ou à la suite d'un marquage enzymatique avec des analogues du sucre. Elle consiste en une bêta élimination des résidus présentant une liaison O-glycosidique sur les protéines en les remplaçant par du DTT. Ces protéines ou peptides ainsi modifiés peuvent être purifiés par chromatographie d'affinité thiol-sépharose (*Vosseller et al. 2005; 2006; Fahie et al. 2021*).

- Enzymatique : les hexosaminidases

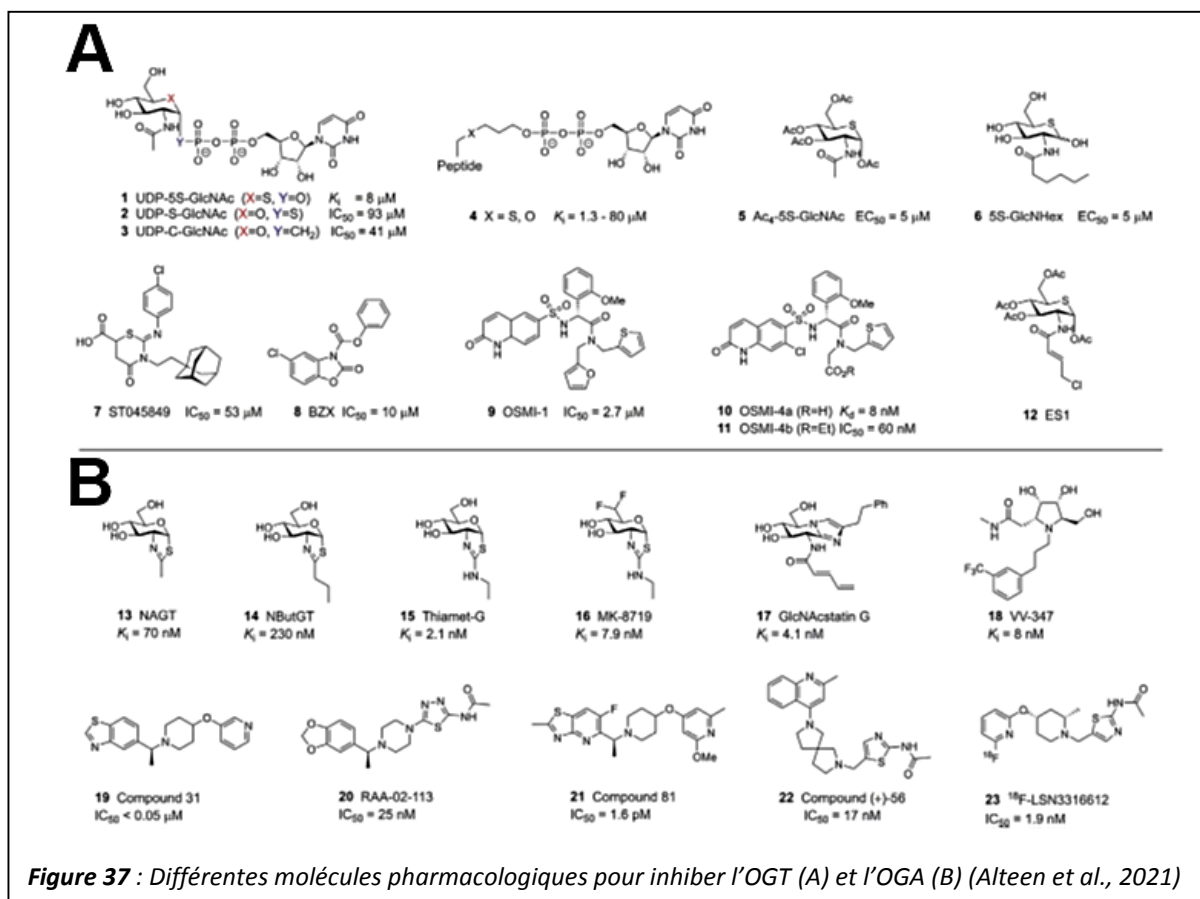
Afin de libérer le motif O-GlcNAc des protéines, il est également possible d'utiliser une approche enzymatique. Les enzymes alors utilisées sont des hexosaminidases qui permettent de catalyser l'hydrolyse des résidus N-acétyl-D-hexosamines au niveau de liaisons O-glycosidique des protéines (*Alonso et al., 2014*).

d) Utilisation des gels 2D

La méthode par gel 2D consiste en une première dimension qui permettra la séparation des protéines selon leur point isoélectrique tandis que la seconde dimension séparera les protéines en fonction de leur masse moléculaire comme un SDS-PAGE classique. Afin de détecter les protéines O-GlcNAcylées dans ces gels, il est possible de marquer au préalable les échantillons par des fluorophores spécifiques ou bien, après la séparation électrophorétique, les gels peuvent être mis au contact de colorants fluorescents tels que le ProQ Emerald, le SuproRuby ou bien l'Alexa 488 capables de détecter la O-GlcNAcylation (*Cieniewski-Bernard et al. 2014*).

e) Approches génétique et pharmacologique

Afin d'étudier la O-GlcNAcylation, il est également possible d'intervenir sur ses enzymes régulatrices. Pour cela, de plus en plus d'agents pharmacologiques, tels que des inhibiteurs de l'OGT et l'OGA, ont été développés afin de faire varier et d'analyser le taux d'O-GlcNAcylation (pour revue, *Alteen et al., 2021*) (**figure 37**). Cette partie sera développée dans le premier paragraphe du « matériel et méthodes ». Il est également possible d'intervenir génétiquement sur ces enzymes afin de les surexprimer, de les inhiber ou de les réguler de manière spécifique (*Lubas et Hanover 2000; Ramirez et al. 2020; 2021; Ge et al. 2021*).



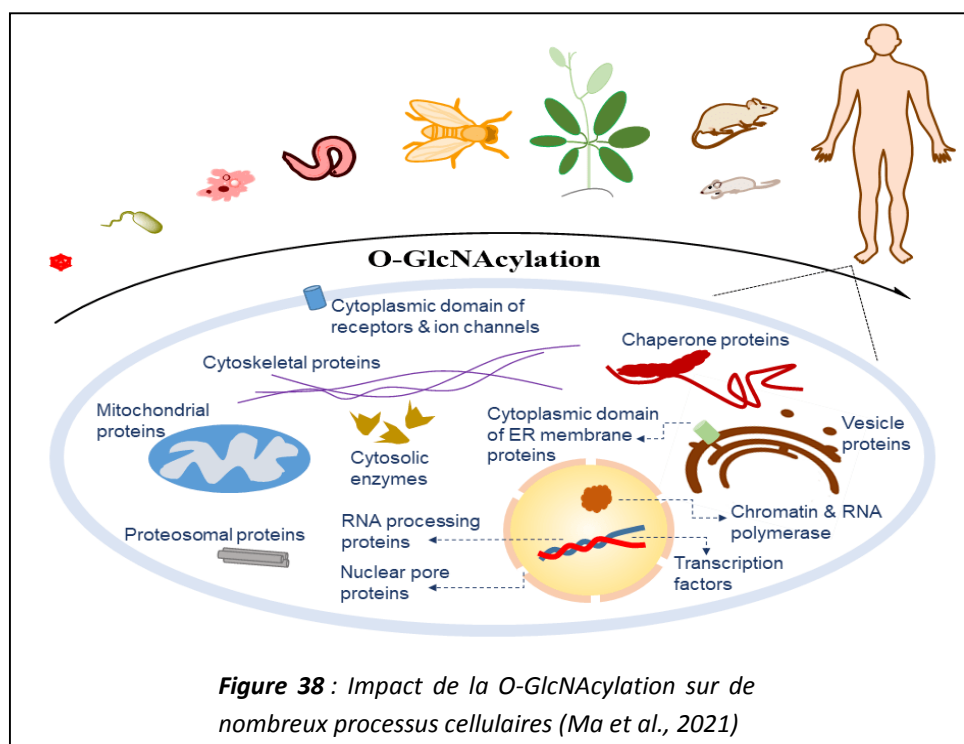
f) Méthodes protéomiques

La plupart des méthodes protéomiques utilisées débutent par une étape de purification qui est suivie (« label-based ») ou non (« label-free ») d'un marquage des protéines avant l'analyse par spectrométrie de masse qui permettra une quantification relative. Cette dernière peut nécessiter la fragmentation du peptide (MS2) ou pas (MS1). Lorsque l'approche « label-free » est utilisée, les peptides pourront être identifiés par comptage des spectres ou par l'intensité de l'ion (Megger et al. 2013). Lorsqu'un marquage est requis (« label-based »), il peut être :

- Chimique : ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) ou ICPL (Isotope-Coded Protein Label) (Y. Zhang et al. 2013)
- Enzymatique : l'isotope est ajouté aux protéines lors de la coupure enzymatique (Julka et Regnier 2004)
- Métabolique : l'isotope est introduit dans les protéines pendant leur synthèse sur des cellules, SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) ou bien sur des tissus, SILAM (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Mammals) (S.-E. Ong et al. 2002; Liao et al. 2008)
- Isotopique avec fragmentation des peptides : iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) ou TMT (Tandem Mass Tag) (Ross et al. 2004; Thompson et al. 2003)

E) La O-GlcNAcylation impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires

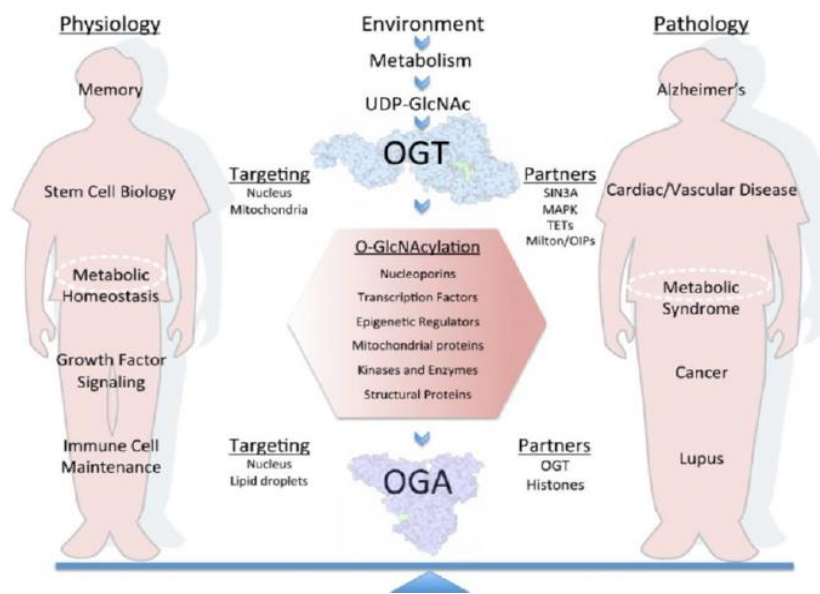
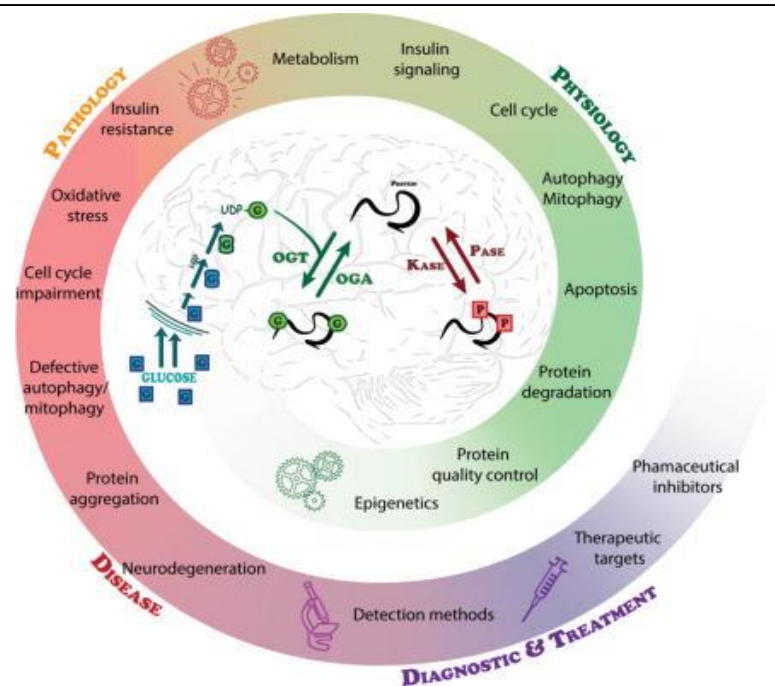
Les différentes techniques citées précédemment ont permis de mener des recherches qui ont pu mettre en évidence l'importance de la O-GlcNAcylation au sein de l'organisme (*Fehl et Hanover 2022*). Présente dans différents compartiments de la cellule tels que le noyau, le cytoplasme et les mitochondries (*Eustice, Bond, et Hanover 2017*), la O-GlcNAcylation pourrait moduler certaines fonctions des protéines telles que leur stabilité, leur localisation ou les interactions avec leurs partenaires protéiques (*Love et Hanover 2005; Butkinaree et al., 2010; Bond et Hanover 2015*). Cette MPT modifie un grand nombre de protéines, dont les fonctions sont très variées, et agirait alors sur de nombreux processus et fonctions cellulaires tels que la transduction du signal, la transcription, la traduction, l'autophagie, l'apoptose, l'assemblage du cytosquelette, la réponse immunitaire, l'inflammation, la reprogrammation métabolique, le trafic des protéines et des organites ou la dégradation protéique (*Liu et al. 2022; Dang et al. 2022*) (**figure 38**).



De plus, via son lien avec de nombreux métabolismes (glucides, acides aminés, acides gras et nucléotides), la O-GlcNAcylation est une MPT qui reçoit et intègre divers signaux internes et externes à l'organisme (*Ong et al., 2018*). Cette particularité physiologique lui permet d'être très sensible à la disponibilité des nutriments et aux changements environnementaux (*Hanover et al., 2010; Zhu et Hart 2021*). Ainsi, cette MPT est un véritable senseur nutritionnel mais également un bon capteur de stress. Grâce à ces propriétés, la O-GlcNAcylation participe à de nombreux mécanismes biologiques et peut induire des réponses moléculaires et physiologiques rapides et adaptées afin de rétablir une certaine homéostasie (*Liu et al. 2022*).

Enfin, très abondante dans le cerveau, le foie, le pancréas, le muscle squelettique, le tissu adipeux et bien d'autres organes et tissus, la O-GlcNAcylation joue un rôle de régulateur clé dans leur physiologie et physiopathologie de nombreux systèmes (nerveux, circulatoire, respiratoire, endocrine, respiratoire, digestif, moteur, etc.) (Chatham et al., 2021; Liu et al. 2022). Puisque la O-GlcNAcylation est un senseur nutritionnel, elle sera très sensible aux changements environnementaux, notamment la disponibilité en nutriments. Elle pourra donc moduler diverses fonctions cellulaires et ainsi influencer sur de nombreux processus physiologiques tels que l'immunité, le métabolisme ou la mémoire. De ce fait, lorsque l'homéostasie de la O-GlcNAcylation est perturbée, cela peut conduire à la mise en place de pathologies telles que les maladies métaboliques, neurodégénératives, cardiovasculaires, auto-immunes ou dans les processus de cancérisation (Nie et Yi 2019) (Figure 39).

Figure 39 : Implication de la O-GlcNAcylation sur l'homéostasie physiologique et le développement de pathologies (Bond et Hanover, 2015 ; Ilhan Akan et al., 2017)



II) La phosphorylation et sa dynamique avec la O-GlcNAcylation

Découverte en 1906 (*Levene et Alsberg, 1906*) et connue comme étant la plus étudiée, la phosphorylation est une MPT réversible qui permet, en présence d'ATP, d'ajouter ou d'enlever un groupement phosphate sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine d'une protéine, modifiant ainsi ses propriétés physico-chimiques (*Nishi et al., 2014*). En effet, l'ajout de ce groupement phosphate confère deux charges négatives, pouvant conduire à des changements conformationnels à la protéine ainsi modifiée. A ce jour, il existe environ entre 100 000 et 500 000 sites potentiels de phosphorylation et entre 30 à 50% des protéines pourraient être phosphorylées chez l'Homme. Ce mécanisme est régulé par des enzymes particulières : environ 520 kinases vont permettre l'ajout du groupement et près de 150 phosphatases vont l'hydrolyser. On estime que 2 à 5% du génome humain code pour ces enzymes (*Ubersax et Ferrell 2007*).

A) Mécanismes d'action des kinases et phosphatases

Les protéines kinases font partie de la plus large famille de gènes puisqu'elles comptent plus d'une dizaine de membres caractérisés par un domaine catalytique dont la structure est très proche (**figure 40**). Parmi ces membres, on peut trouver les CAM (calcium calmoduline) kinases, les tyrosine kinases, les caséine kinases, le groupe CMGC (cyclin-dépendant, MAPK, GSK et CDK-like kinase) ou bien le groupe des AGC (protein kinase A, G et C).

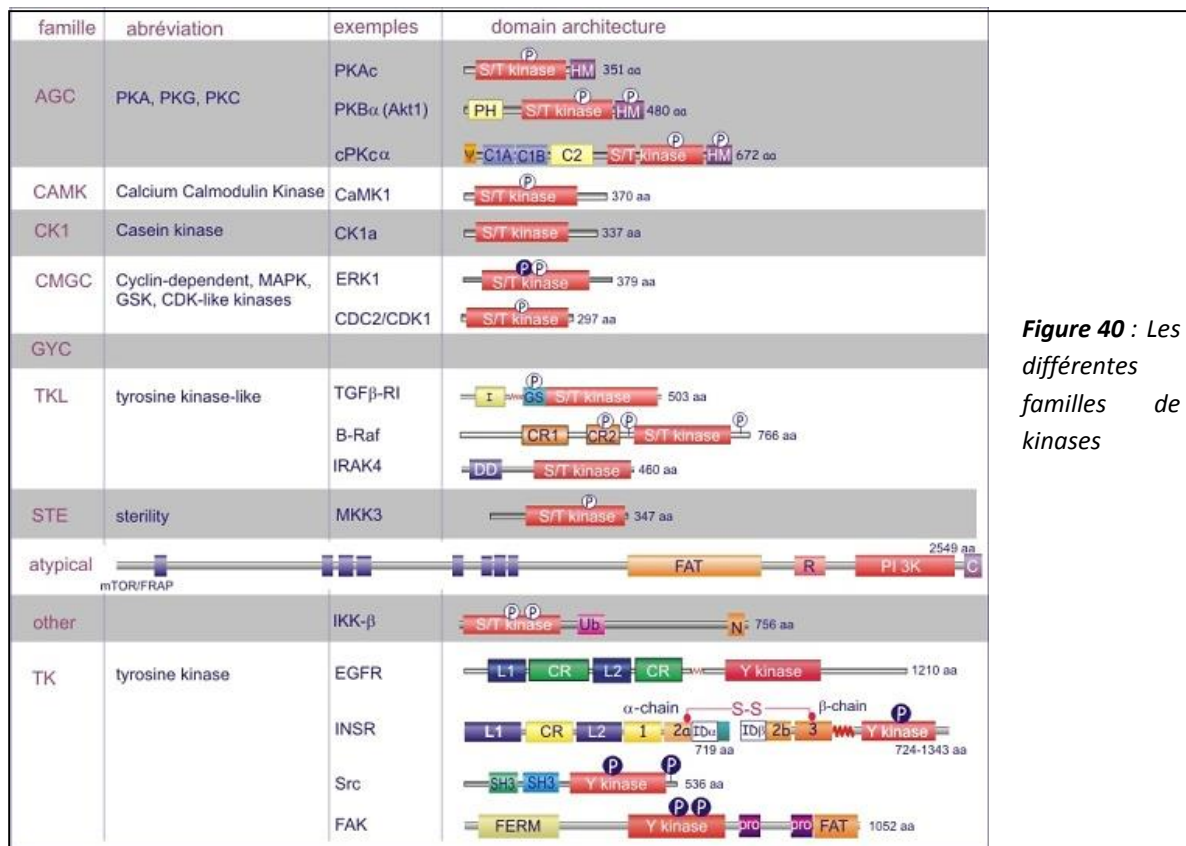


Figure 40 : Les différentes familles de kinases

Alors que les tyrosines kinases représentent le groupe le plus important pour la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, ce sont les sérine/thréonine kinases qui sont en plus grand nombre. Il faut savoir qu'avant de jouer leur rôle, les kinases sont elles-mêmes soumises à des régulations soit pour assurer le bon positionnement de l'ATP ou alors pour les rendre accessibles à leur substrat. C'est le cas de la protéine kinase A (PKA) composée d'une unité catalytique et d'une unité régulatrice bloquante. Si cette dernière n'est pas éliminée par l'AMPc, l'enzyme ne pourra pas accéder à son substrat (**figure 41A**). D'autres kinases telles que les protéines kinases C et G (PKC et PKG) ou bien les calcium calmoduline kinases (CamK) possèdent un domaine « pseudo-substrat » qui mime leur propre substrat mais qui ne peut être phosphorylé. Dans ce cas, il existera un changement de conformation de ces kinases dès lors que leur substrat sera fixé afin de déplacer ce domaine particulier et de les rendre actives (**figure 41B**). Enfin, les tyrosine kinases sont une famille d'enzymes activées par les facteurs de

croissance (par exemple EGF : epithelial growth factor, PDGF : platelet-derived growth factor et VEGF : vascular endothelial growth factor) et les hormones. Dès leur activation, elles s'auto-phosphorylent avant de phosphoryler d'autres protéines en aval grâce à l'ATP. Cette cascade de signalisation est un élément crucial pour maintenir la communication et l'homéostasie entre les cellules (*Hunter 2000*). Alors que certaines kinases ont un spectre d'activité très large comme la PKA, d'autres sont très spécifiques d'un substrat donné telle que la MLC (myosin light chain) kinase (*Johnson et Lewis 2001*). Parfois, une seule kinase peut modifier plusieurs sites sur une protéine cible (*Patwardhan et Miller 2007*). C'est le cas des kinases de la famille Src qui peuvent phosphoryler plusieurs sites d'un substrat contenant le domaine de liaison SH2 (Src homology 2) et ce, de manière processive (*Scott et Miller 2000*).

Même si elles sont moins nombreuses que les kinases, les phosphatases sont également très importantes pour la régulation du processus. Il existe comme pour les kinases, plusieurs familles de phosphatases qui sont définies selon le résidu qu'elles vont cibler (**figure 42**). On distingue alors les protéines phosphatases tyrosine (PTP), sérine (PPP) et thréonine (PPM) (*Bertolotti 2018; Kamada et al. 2020*).

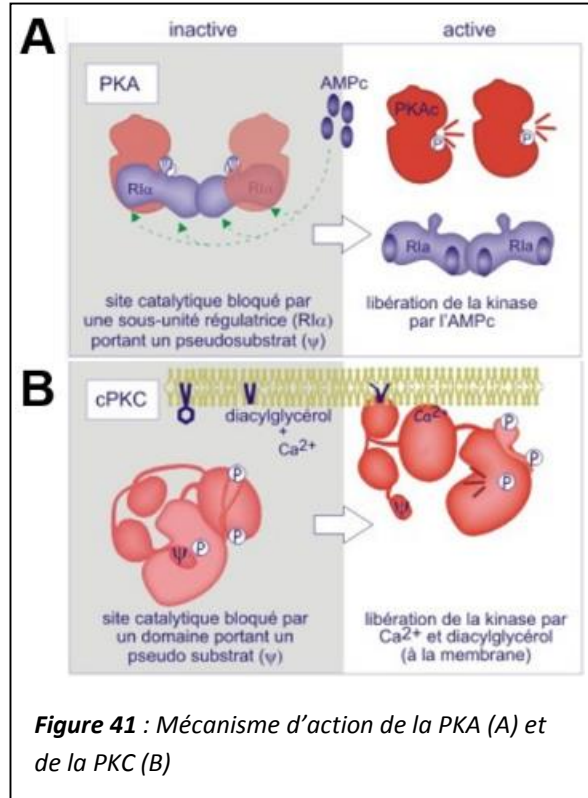
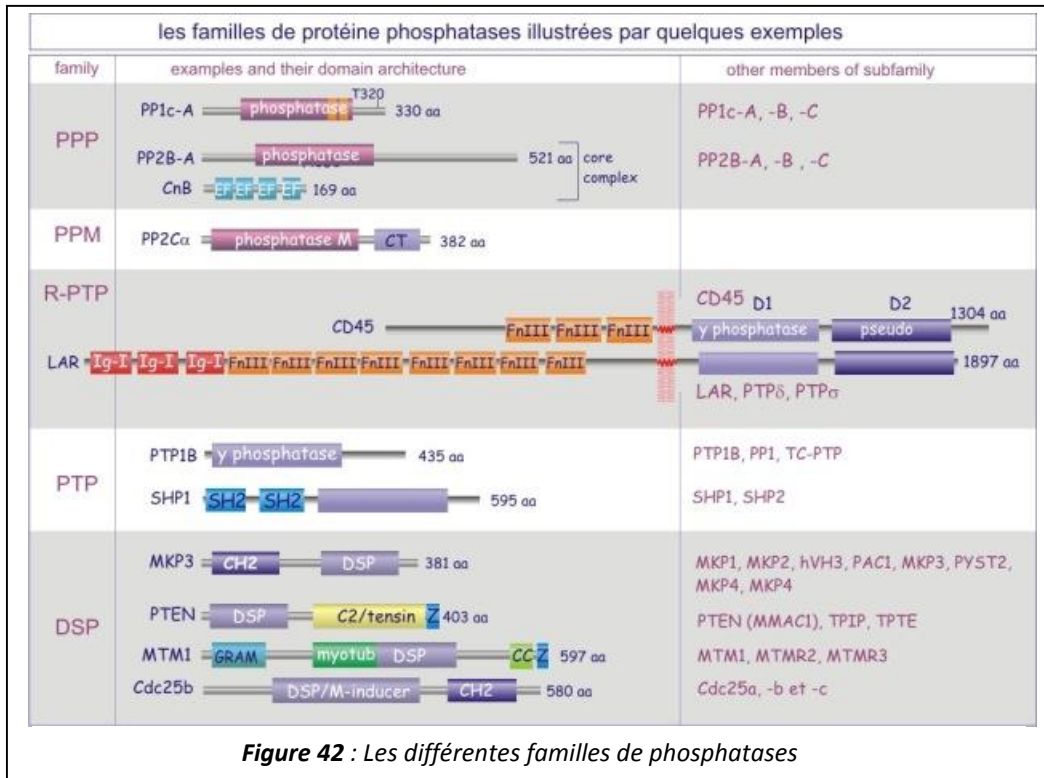
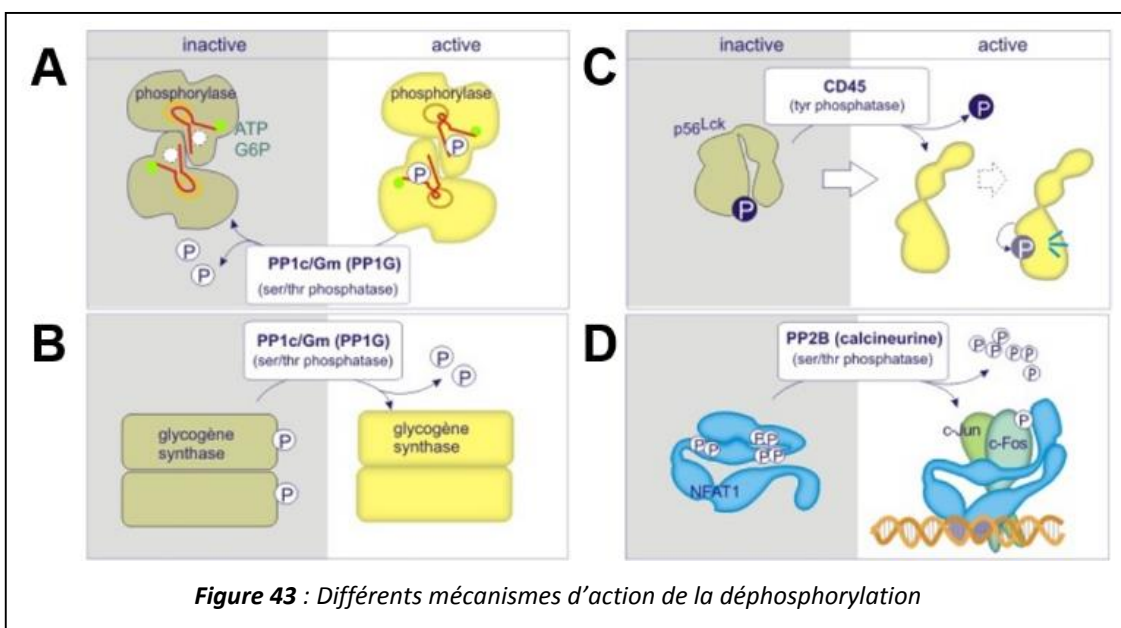


Figure 41 : Mécanisme d'action de la PKA (A) et de la PKC (B)



Cette déphosphorylation peut avoir des conséquences totalement opposées. Elle peut dans un premier temps, servir de remise à zéro afin de ramener l'activité protéique à un état basal, comme c'est le cas pour PP1G qui converti la phosphorylase a (active) en phosphorylase b (peu active) (**figure 43A**). A l'inverse, certaines protéines sont phosphorylées dans leur état de repos et nécessitent d'être déphosphorylées pour être actives, comme la glycogène synthase par exemple (**figure 43B**), ou encore certaines protéines kinases comme Src ou Lck (**figure 43C**) ou des facteurs de transcriptions tels que c-Jun ou NFAT (**figure 43D**).



Puisqu'il existe de nombreuses kinases et phosphatases, cette MPT sera impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, le transport membranaire, la dégradation protéique, l'activation d'enzymes ou bien la modulation des interactions protéine-protéine en raison de l'encombrement stérique ou de la force électrostatique du groupement (Lu et al. 2013; V. Singh et al. 2017). C'est pourquoi, une perturbation de la phosphorylation peut être la cause d'altération des protéines structurales, régulatrices ou fonctionnelles et provoquer l'apparition de pathologies telles que les cancers (Hanahan et Weinberg 2000). En effet, une augmentation ou une diminution anormale de la phosphorylation est la principale cause d'une altération de la transduction du signal (Radivojac et al. 2008).

B) La dynamique phosphorylation / O-GlcNAcylation

La phosphorylation et la O-GlcNAcylation présentent de très fortes similarités puisqu'elles possèdent des caractéristiques communes en terme de dynamique, de réversibilité, d'abondance au sein de la cellule, de mécanisme d'action par un couple d'enzymes et enfin de leur impact sur les fonctions des protéines qu'elles ciblent (Gerald W. Hart et al. 2011). De par leurs ressemblances, certaines études se sont intéressées aux mécanismes régulés par ces deux MPT et si elles pourraient agir l'une avec ou contre l'autre. La phosphorylation pourrait en effet jouer un rôle sur la O-GlcNAcylation. C'est le cas de la protéine Tau dont le niveau d'O-GlcNAcylation diminue lorsqu'elle est hyperphosphorylée en particulier lors de la maladie d'Alzheimer (Arnold et al. 1998) mais également des protéines kinases A et C (PKA et PKC) qui, lorsqu'elles sont actives, diminuent le taux d'O-GlcNAcylation des protéines cytosquelettiques tandis que leur inhibition augmente le taux d'O-GlcNAcylation (Griffith et Schmitz 1999). Autre exemple, une hyperphosphorylation globale induite par un traitement à l'acide okadaïque entraînerait une diminution du niveau d'O-GlcNAcylation (Lefebvre et al. 1999). Enfin, l'inhibition de la kinase GSK3 (glycogen synthase kinase-3) induirait des changements drastiques de la O-GlcNAcylation de différentes protéines (Wang et al., 2007).

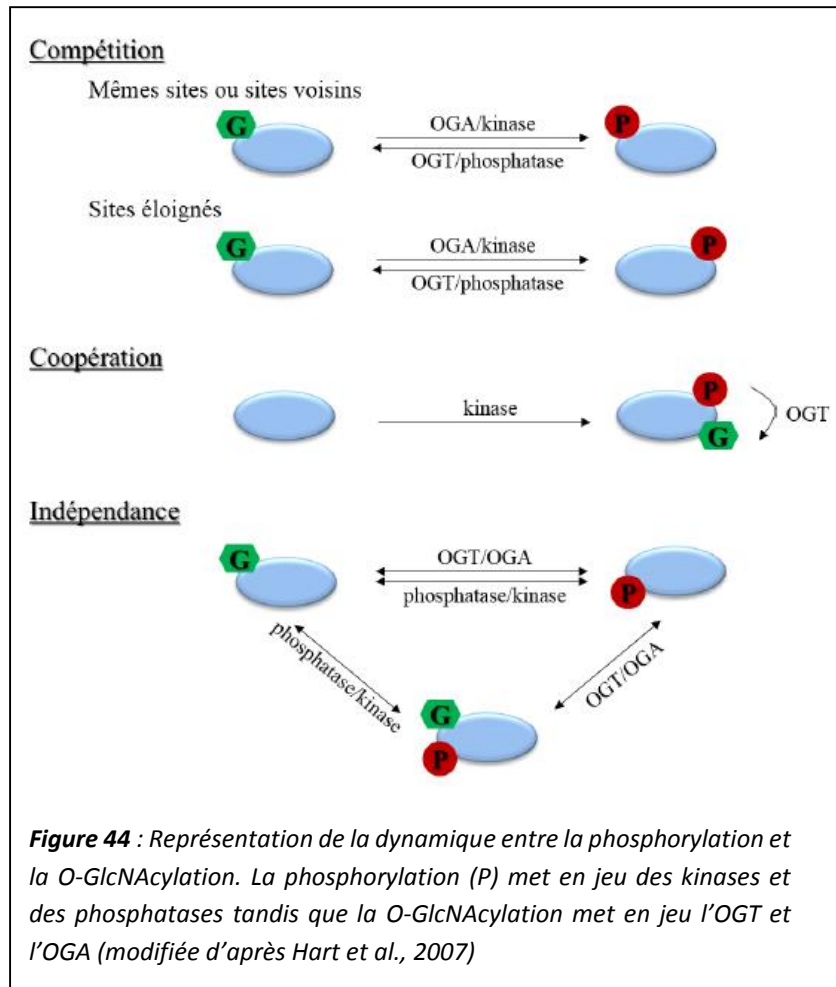
A l'inverse, la O-GlcNAcylation pourrait également venir moduler la phosphorylation de certaines protéines. Wang et collaborateur ont ainsi mis en évidence qu'une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation modulait grandement la stœchiométrie de la phosphorylation (Wang et al., 2008). De plus, une augmentation globale de la O-GlcNAcylation permettrait d'augmenter la phosphorylation de la synapsine I/II sur les sérines 9, 62, 67 et 603 au sein de l'hippocampe (Tallent et al. 2009). Enfin, une augmentation de la O-GlcNAcylation de Tau diminue sa phosphorylation (Arnold

et al. 1998; Yuzwa et Vocadlo 2009). Ces différents exemples mettent en évidence une dynamique complexe entre les deux MPT.

C) Les mécanismes sous-jacents et sites modifiés

Puisque la phosphorylation et la O-GlcNAcylation vont modifier les mêmes résidus (sérine et thréonine) de protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales, elles pourraient potentiellement modifier les mêmes sites (Hu et al., 2010). De plus, des techniques reposant sur la spectrométrie de

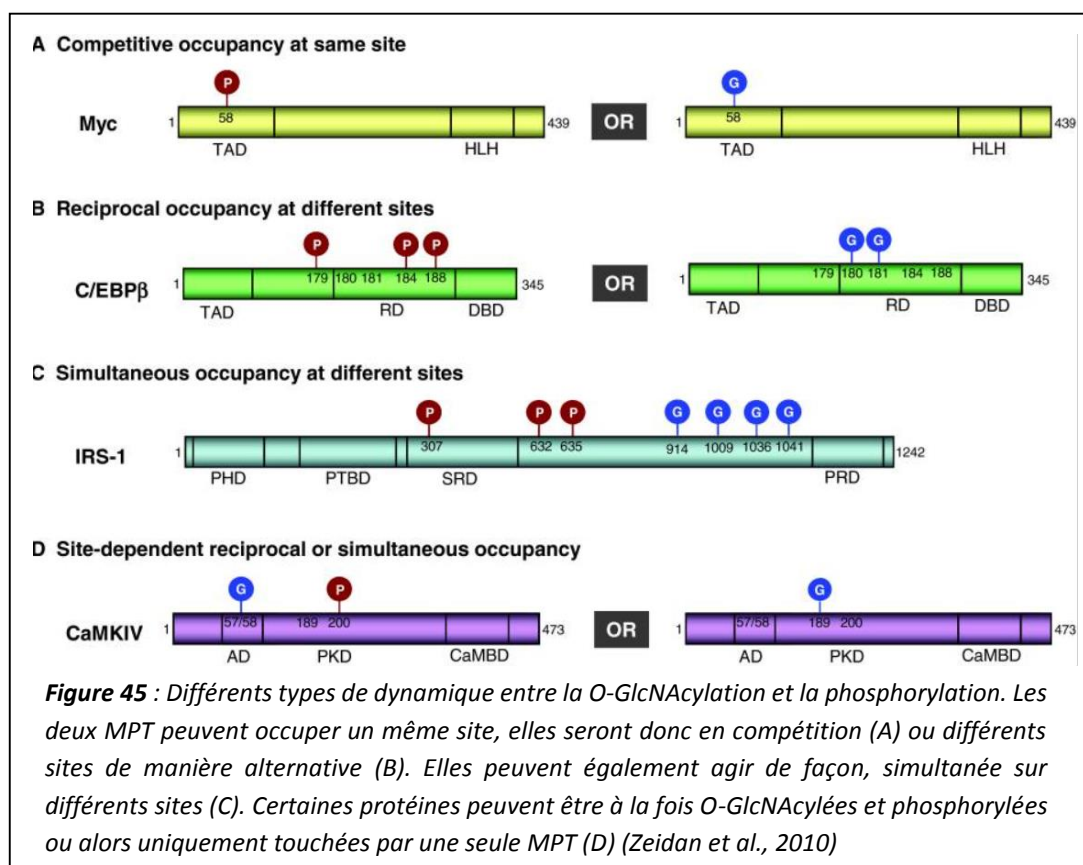
masse ont permis d'identifier les sites de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation des protéines (Zachara 2009; Zihao Wang et al. 2010). Il a été démontré que ces deux modifications pouvaient intervenir sur des sites protéiques communs ou bien totalement indépendants (Hart 1997; Zeidan et Hart 2010). Hardivillé et Hart ont ainsi établi plusieurs mécanismes pour parler de la dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation (Hardivillé et Hart 2014). En effet, il peut s'agir d'une compétition sur



un même site ou sur un site distant, ou bien une coopération entre les deux MPT ou enfin d'une indépendance de chaque MPT sur un site (figure 44) (Zeidan et Hart 2010).

Il existe différents exemples pour venir illustrer ces différents mécanismes. Lorsque le même site est touché, comme c'est le cas pour de la thréonine 58 du domaine de transactivation de la protéine c-Myc, les deux MPT sont mutuellement exclusive et peuvent alors entrer en compétition (figure 45A) (Chou, Hart, et Dang 1995). Il existe un autre cas de figure où il existe une modification alternative de certains sites. C'est le cas du domaine de régulation du facteur de transcription C/EBPβ (enhancer-binding protein β) qui peut soit être phosphorylés sur les thréonines 179, 188 et la sérine

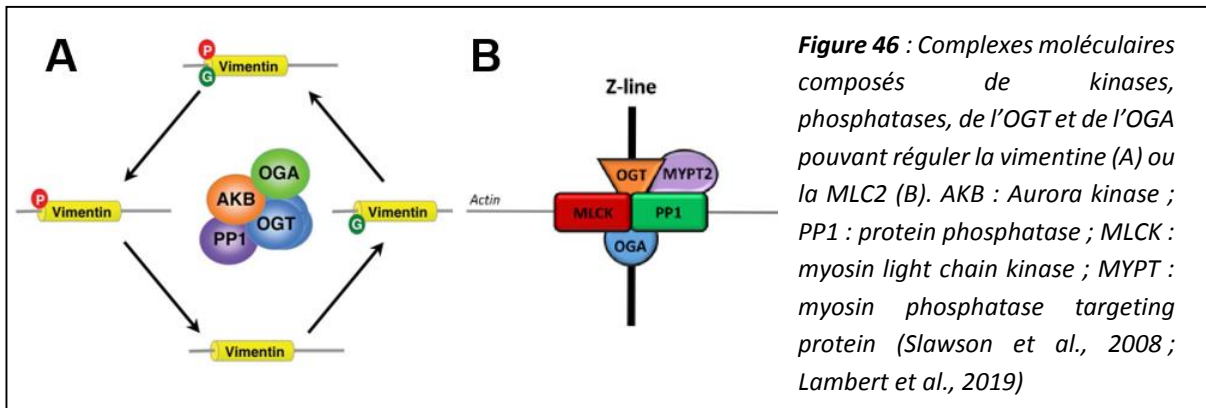
184 ou alors O-GlcNAcylé sur les sérines 180 et 181 (**figure 45B**) (David, 1995). Enfin, certaines protéines peuvent avoir des sites à la fois phosphorylés et O-GlcNAcylés. IRS-1 (insulin receptor substrate) est un exemple de ce phénomène puisque la protéine est phosphorylée sur ses sérines 307, 632 et 635 tandis que son domaine C-terminal est O-GlcNAcylé au niveau de nombreux sites (**figure 45C**) (Gual et al., 2005). Il existe également un phénomène de coopération où la présence d'une des deux modifications est nécessaire afin que la deuxième soit mise en place comme pour le cas de la protéine CREB dont la phosphorylation peut augmenter son O-GlcNAcylation (Hardivillé et Hart 2014), rendant le mécanisme encore plus complexe.



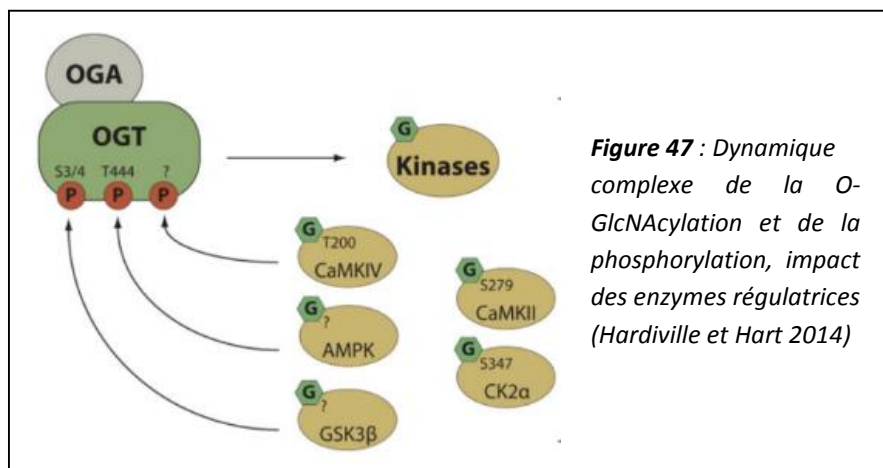
D) L'interaction entre les enzymes responsables des mécanismes

Il s'avère que les enzymes responsables de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation peuvent elles-mêmes être phosphorylées ou O-GlcNAcylées rendant la dynamique et l'interaction entre ces MPT encore plus complexes (Hardivillé et Hart 2014). En effet, le couple OGT/OGA est connu pour s'associer et modifier les couples kinases/phosphatases (Khidekel et al. 2004; Wells et al. 2004). Slawson et collaborateurs ont ainsi montré que ces enzymes faisaient partie d'un complexe supra-macromoléculaire fonctionnel impliquant OGT, OGA, PP1 (proteine phosphatase 1) et AKB (Aurora kinase B) et pouvant modifier la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires importante pour la structuration du cytosquelette (Slawson et al. 2005; 2008) (**figure 46A**). De plus, il a été démontré

au laboratoire que les enzymes impliquées dans la phosphorylation de la MLC2 (myosin light chain 2) à savoir la MLC kinase, PP1 et MYPT2 (myosin phosphatase target 2) existent notamment sous forme d'un complexe multienzymatique avec l'OGT et l'OGA au niveau de la strie Z du muscle squelettique (Cieniewski-Bernard, et al. 2014) (**figure 46B**). De manière intéressante, il semble que ce complexe multienzymatique puisse être modulé lors de l'exercice ou de l'atrophie musculaire (Lambert et al. 2019).



Par ailleurs, certaines kinases peuvent en effet voir leur activité modifiée par la O-GlcNAcylation telles que la PKC, ERK (extracellular signal-regulated kinase), cAMPK (cAMP-dependent protein kinase), CamKIV (calcium/calmoduline-dependent protein kinase IV) (Griffith et al., 1995; Matthews et al., 2005; Lima et al. 2009; Dias et al. 2009; Sun et Hu 2016). A l'inverse, les enzymes responsables de la O-GlcNAcylation peuvent être phosphorylées, en particulier par AMPK, CamKIV et GSK3β modifiant ainsi leur activité (Cheung et Hart 2008; Bullen et al. 2014; Hardivillé et Hart 2014; Very et al. 2018) (**figure 47**).



INTRODUCTION

Partie 3 : MPT et physiopathologie du muscle squelettique

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses protéines sont soumises à des modifications post-traductionnelles. Qu'elles soient motrices, régulatrices ou structurales, les MPT vont jouer un rôle sur la fonction et la régulation des protéines du muscle squelettique. En particulier, elles sont des régulateurs forts des filaments intermédiaires puisqu'elles peuvent interférer dans la fine modulation de leur dynamique et de leur interaction en réponse aux voies de signalisation par exemple (Srikanth et al., 2010; Hyder et al. 2011; Snider et Omary 2014; Sanghvi-Shah et Weber 2017; Tarbet et al. 2018).

I) Rôle de l'ubiquitination

De nombreuses protéines sarcomériques peuvent être ubiquitinylées (Su et al. 2015; Volodin et al. 2017), ce qui signifie qu'elles vont être greffées de manière covalente d'un motif ubiquitine. Ce groupement ainsi fixé permettra d'adresser les protéines au protéasome en vue de leur dégradation ; c'est ce qu'on appelle le système UPS (Ubiquitin-proteasome system) (Nandi et al. 2006). Brièvement, il s'agit d'une cascade enzymatique impliquant l'enzyme E1 qui se fixe à l'ubiquitine afin de l'activer, ensuite, l'ubiquitine est transférée sur l'enzyme E2 qui se lie à l'enzyme E3 permettant de sélectionner un substrat dans le but d'y fixer l'ubiquitine (Figure 48).

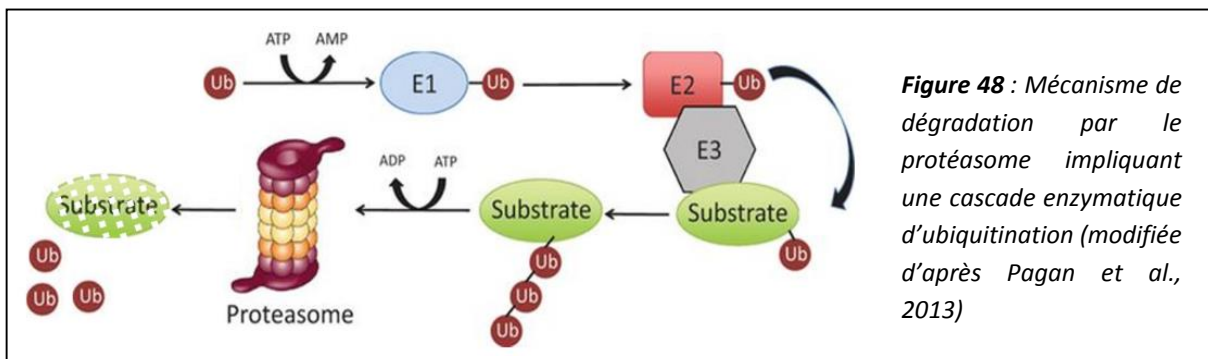
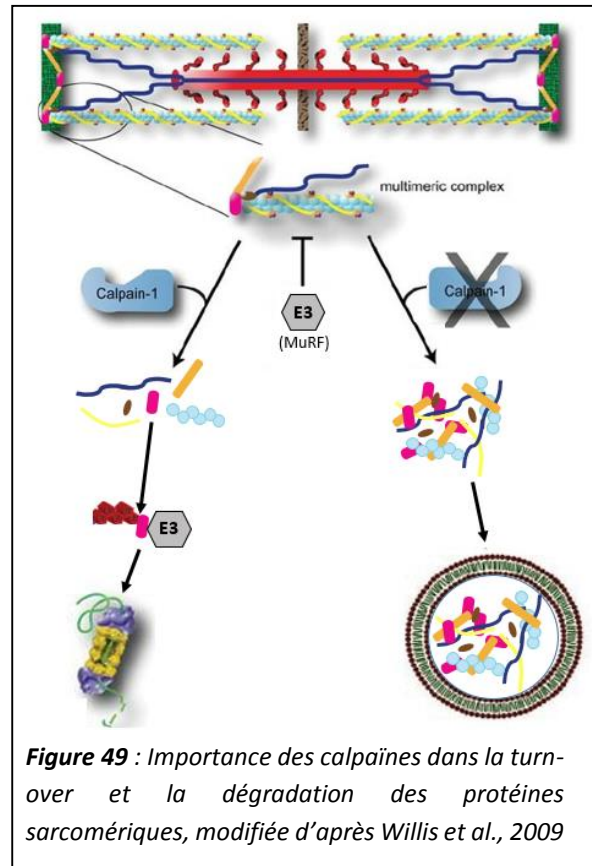


Figure 48 : Mécanisme de dégradation par le protéasome impliquant une cascade enzymatique d'ubiquitination (modifiée d'après Pagan et al., 2013)

Dans le muscle squelettique ou d'autres tissus, la mise en place de ce système est observée pour effectuer un turn-over protéique (Carlisle et al., 2017). En effet, afin de maintenir une dynamique importante du cytosquelette sarcomérique, certaines protéines impliquées dans le système vont faire partie intégrante du sarcomère. C'est le cas des protéines MuRF (muscle RING-finger) qu'on retrouve dans les muscles striés liées au sarcomère par des protéines de structures comme la desmine et qui jouent un rôle d'ubiquitine ligases (enzyme E3) (McElhinny et al. 2004; Lodka et al. 2016). On trouve également les calpaïnes, qui, lorsqu'elles sont activées, vont permettre de dissocier les complexes protéiques en vue de leur dégradation par le protéasome (Kandarian et Jackman 2006; Portbury et al., 2011) (figure 49, gauche). En revanche, lorsque celles-ci ne jouent pas leur rôle, on peut observer des

agrégations protéiques (**figure 49**, droite) et une augmentation de la voie de l'autophagie (**figure 49**, droite).

Ce système UPS est également mis en place lorsqu'il existe une accumulation de protéines mal conformées. Il permet alors de rétablir une certaine homéostasie cellulaire et d'éviter l'apparition ou l'aggravation de pathologies (*Wang et Le 2019*). A l'inverse, une altération de ce système peut conduire à une dégradation trop importante des protéines. Dans le muscle squelettique, cela peut aboutir à une perte importante de masse musculaire et une atrophie (*Kitajima et al., 2020*).



II) Rôle de la phosphorylation

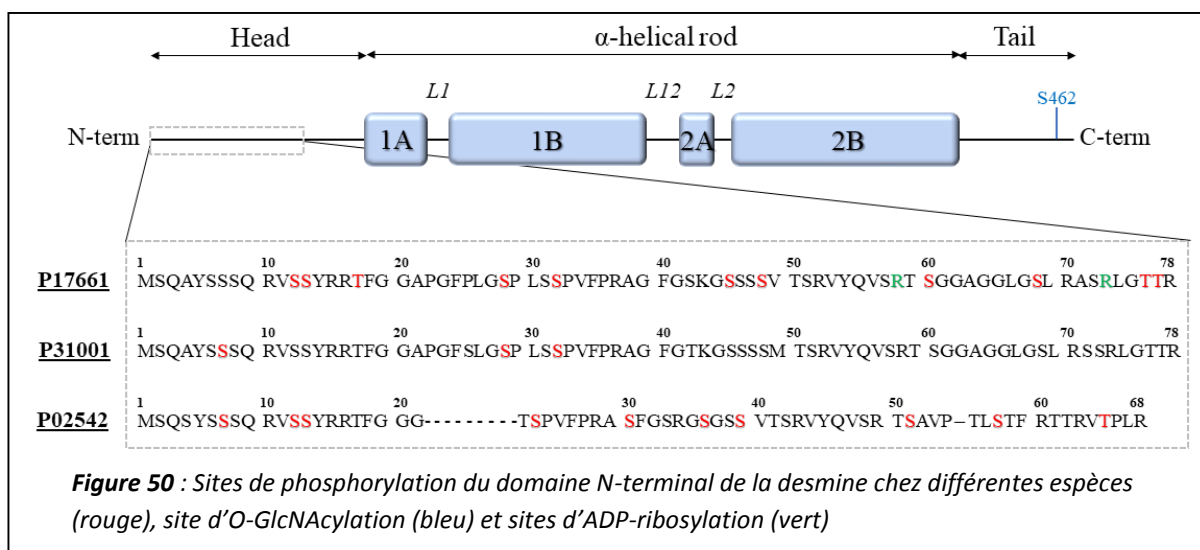
Comme énoncé précédemment, la phosphorylation est une MPT qui va toucher de nombreuses protéines de l'organisme (30 à 50% chez l'Homme). Par cette abondance, elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Une dérégulation de cette MPT pourra provoquer des désordres divers et variés au niveau inflammatoire, auto-immune, neurologique pouvant conduire à l'apparition de pathologies telles que le diabète, l'obésité ou encore les maladies cardiovasculaires (*Borgo et al. 2021*).

Dans le muscle, la phosphorylation module l'architecture (*Tylková 2009; Taylor et al. 2016*), la contractilité (*Szczesna et al. 2002*) et la contraction du sarcomère (*Kooij et al., 2011; Hidalgo et Granzier 2013*) mais joue également un rôle dans les mécanismes d'atrophie et d'hypertrophie (*Glass 2010*). Lorsque celle-ci n'est plus correctement régulée, cela peut entraîner une résistance à l'insuline (*Abdul-Ghani et DeFronzo 2010*) pouvant aller jusqu'à l'apparition d'un diabète de type 2 (*Petersen et Shulman 2002*). Un défaut de phosphorylation est également impliqué dans la physiopathologie des myopathies mitochondriales caractérisées par des affections musculaires progressives dont la cause principale est un défaut de phosphorylation dans les mitochondries entraînant un déficit de production d'énergie (*Ahmed et al. 2016*). La plupart de ces études ont été réalisées sur le muscle cardiaque bien

qu'il existe aujourd'hui de plus en plus d'études sur le rôle de la phosphorylation dans le muscle squelettique. En particulier, de nombreuses données ont permis de mettre en évidence le rôle de la phosphorylation dans la modulation des fonctions de la desmine et de son chaperon moléculaire, comme nous allons le voir ci-après.

A) Effets de la phosphorylation sur la desmine

Décrite pour la première fois en 1979 (Gard et al., 1979; O'Connor et al., 1979), la phosphorylation de la desmine touche plutôt la tête N-terminale puisqu'elle est la cible de nombreuses kinases régulant la fonction des FI (Winter et al. 2014). En particulier, la phosphorylation de la partie N-terminale de la desmine est impliquée dans le désassemblage et la solubilisation des FI (Inagaki et al. 1987) (figure 50). En ajoutant des charges négatives, elle participe au changement d'encombrement de la protéine ce qui peut moduler les interactions entre la protéine et ses partenaires.



La desmine est phosphorylée par de nombreuses kinases qui permettent de la connecter à différents processus cellulaires tels que la division cellulaire, la différenciation des myoblastes ou bien la contraction musculaire (Winter et al. 2014). Parmi celles-ci on trouve la Rho kinase, PAK (p21-activated kinase), Aurora kinase, Cdk1, PKA et PKC qui vont phosphoryler la desmine sur des sites spécifiques ayant des conséquences cellulaires différentes (tableau 1). La Rho kinase (ou ROK), de la famille des kinases qui dépendent du GTP et dont l'activité est augmentée après l'exercice, est impliquée dans la régulation de la différenciation et du métabolisme musculaire (Landry et al., 2020; Castellani et al. 2006). Cette enzyme conduit à la phosphorylation de la desmine sur les thréonines 17, 76 et 77 et entraîne la perte de sa capacité à former des filaments (Inada et al. 1998; Kawajiri et al.

2003). Les mêmes observations ont été faites lorsque la desmine est incubée en présence de PAK qui touche principalement des résidus sérines dans le domaine N-terminal (Ohtakara et al. 2000). Ces données supportent le fait que ROK et PAK qui touchent des sites différents peuvent avoir le même effet sur les fonctions de la desmine. Ensuite, la desmine est phosphorylée par des kinases impliquées dans le cycle cellulaire telles qu’Aurora kinase qui phosphoryle les sérines 12, 60 et la thréonine 17 et Cdk1 qui phosphoryle les sérines 7, 28 et 32 de la desmine (Kawajiri et al. 2003; Makihara et al. 2016). Il a également été démontré que les kinases sont recrutées de manière différentielle et coordonnée, suggérant que la phosphorylation des FI de desmine soit régulée de manière spatio-temporelle (Nagata et al., 2001; Makihara et al. 2016). De plus, une hyperphosphorylation de la desmine sur sa sérine 32 provoquerait une altération du réseau de desmine entraînant un défaut de mécanotransduction ainsi que des troubles de la biogénèse et du maintien des mitochondries (Giovarelli et al. 2020). Enfin, le domaine N-terminal de la desmine est aussi phosphorylé sur de nombreuses sérines par la PKA et la PKC (Geisler et Weber 1988; Inagaki et al. 1988; Kitamura et al. 1989). Alors que la PKC conduit au désassemblage des FI de desmine et entraîne une inhibition de la prolifération et de la différenciation (Huang et al. 2002), la PKA inhibe la polymérisation des filaments et diminue la fusion des myoblastes en myotubes (Geisler et Weber 1988; Tao et Ip 1991).

Enzyme	Abréviation	Site (chez l’Homme)	Fonction modifiée
Protéine kinase A	PKA	S45, S60	Fusion des myoblastes
Protéine kinase C	PKC	S13, S48, S68	Desminopathies
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	S7, S32, T76	Desminopathies ?
p21-activated kinase	PAK	Différents de Rho-kinase	Contraction musculaire
Rho-associated kinase	Rho-kinase	T17, T76, T77	Contraction musculaire Division cellulaire
Aurora kinase B	Aurora-B	T17, S60	Division cellulaire
Ca ²⁺ /calmoduline-dependent protein kinase II	CamKII	Inconnu	Insuffisance cardiaque ?

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des enzymes et des sites de phosphorylation de la desmine ainsi que leurs conséquences (Winter et al., 2014)

Outre l'action de ces différentes kinases et puisque la phosphorylation est un processus réversible, la desmine sera également la cible de certaines phosphatases. A l'inverse de la phosphorylation qui conduit au désassemblage des filaments de desmine, la déphosphorylation par les phosphatases permet de les réassembler (*Inagaki et al. 1988*). Il a ainsi été démontré que les inhibiteurs de ces dernières altèrent dramatiquement les FI conduisant à la perte de l'intégrité du cytosquelette (*Eriksson et al. 1992; Toivola et al. 1997*). De la même manière, la protéine phosphatase 1 (PP1) s'associe avec la Rho kinase pour réguler finement le turnover de phosphorylation des FI et dans une plus large mesure, de transférer les sous-unités de desmine entre la fraction soluble et filamenteuse (*Inada et al. 1999*). La phosphorylation permet donc d'impacter la mise en place, l'assemblage et la stabilisation de ces filaments (*Inagaki et al. 1988; Winter et al. 2014*) suggérant un impact fort de cette MPT sur l'organisation et la réorganisation du cytosquelette sarcomérique et sur le maintien de la structure du sarcomère.

B) Effets de la phosphorylation sur l' α B-cristalline

Le chaperon de la desmine, l' α B-cristalline est également phosphorylée dans son domaine N-terminal, en particulier sur ses sérines 19, 45 et 59 connues comme étant les sites majeurs (*Bakthisaran et al. 2016; Dimauro et al. 2018*) (**figure 51**).

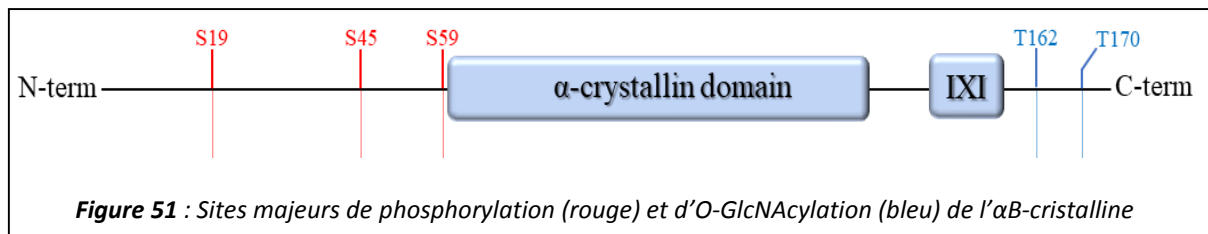


Figure 51 : Sites majeurs de phosphorylation (rouge) et d'O-GlcNAcylation (bleu) de l' α B-cristalline

Alors que les sérines 45 et 59 sont respectivement phosphorylées par p42/44 MAPK et MAPKAP2/3, la kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 19 n'est pas encore connue (*Kato et al. 1998; Ito et al. 1997; Bakthisaran et al. 2016*). Plusieurs études évoquent la phosphorylation comme un régulateur important de l' α B-cristalline. En effet, cette MPT pourrait varier en fonction de la demande cellulaire ou des conditions de stress. Cela conduirait à des changements d'oligomérisation et de localisation de l' α B-cristalline au sein de la cellule pouvant impacter son profil d'activité et/ou ses interactions avec ses partenaires protéiques (*Bakthisaran et al. 2016*). C'est dans ce sens que des études ont montré que la phosphorylation de la protéine était associée à sa translocation au cytosquelette ou aux mitochondries (*Jin et al. 2008; Whittaker et al. 2009*).

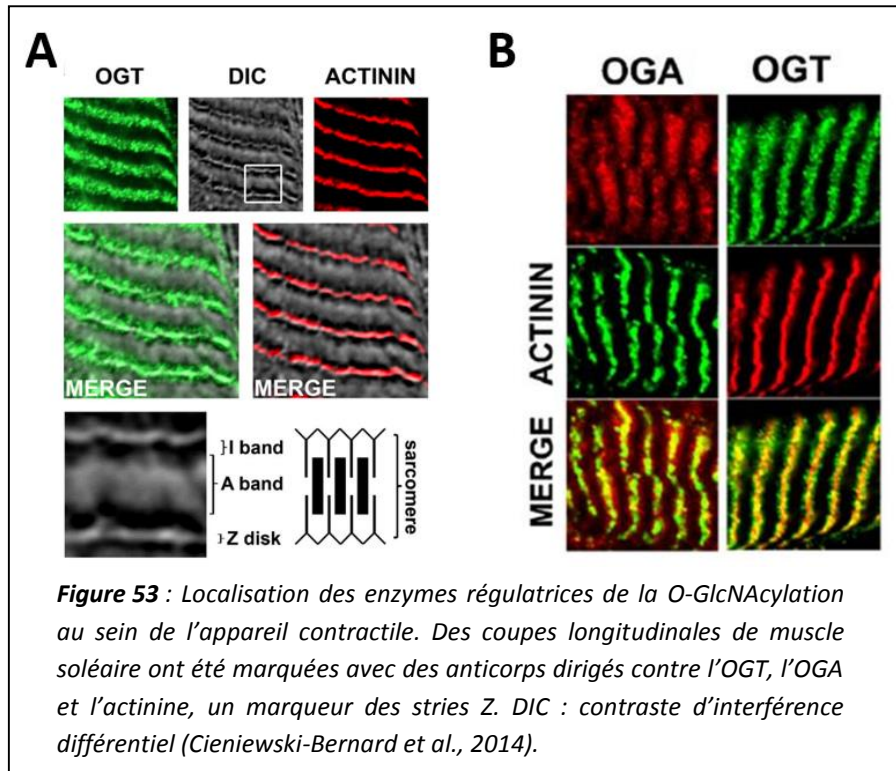
Alors que la phosphorylation de l' α B-cristalline aurait des effets bénéfiques pour lutter contre le stress cellulaire, elle deviendrait irréversible et délétère si le stress perdure dans le temps (Bakthisaran et al., 2015). En effet, la phosphorylation de sa sérine 59 en condition de stress permet d'augmenter son interaction avec l'actine, les microtubules et les FI et donc de stabiliser et préserver le cytosquelette (Ghosh et al., 2007; Singh et al. 2007; Bakthisaran et al. 2016; Antonioni et al. 2020). Cela aurait pour conséquence de maintenir la forme de cellule et d'assurer une protection des cellules musculaires contre un stress mécanique (Collier et Benesch 2020; Höhfeld et al. 2021). Pendant la contraction, ce stress est d'autant plus important aux stries Z et aux bandes I du sarcomère des muscles cardiaque et squelettique, endroit où l' α B-cristalline est préférentiellement localisée. C'est pourquoi la phosphorylation de la protéine va varier pendant l'exercice en fonction de son intensité (endurance ou résistance) ou bien selon le muscle concerné et le type de fibre étudié (Jacko et al. 2020; D'Amico et al. 2021; Dimauro et Caporossi 2022). De plus, alors que l'ischémie cardiaque conduit à la phosphorylation des sérines 45 et 59 et la translocation à l'appareil contractile, à l'inverse, la reperfusion provoque sa dissociation de l'appareil contractile. Malheureusement, cette dernière étude n'est pas corrélée avec la déphosphorylation de l' α B-cristalline (Golenhofen et al. 1998; 1999; Eaton et al. 2001). Enfin, les formes phosphorylées et déphosphorylées de la protéine sont efficaces de la même manière pour prévenir l'assemblage de certaines protéines des FI telles que GFAP et la vimentine (Nicholl et Quinlan 1994).

III) Rôle de la O-GlcNAcylation

Cette glycosylation atypique apparaît être un acteur majeur de régulation de nombreux procédés biologiques. Cependant, bien que de plus en plus d'études s'intéressent à son impact dans le cadre de pathologies telles que les cancers (Parker et al., 2021), l'obésité (Yang et al. 2020), le diabète (Chen et al., 2019), les maladies cardiovasculaires (Umapathi et al. 2021) ou neurodégénératives (Lee et al., 2021), son rôle dans le cadre de pathologies musculaires est encore mal compris (Chatham et al., 2021). Des recherches ont alors été menées afin d'élucider le rôle de cette MPT dans le muscle squelettique mais très peu s'intéressent aux mécanismes physiopathologiques. En effet, dans le muscle squelettique, de nombreuses protéines vont être O-GlcNAcylées (figure 52).

Figure 52 : Schéma récapitulatif de l'ensemble des protéines musculaires et leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation, O-GlcNAcylation et ubiquitination) (Liu et al., 2022)

De manière intéressante, il a été démontré au laboratoire que l'OGT et l'OGA, les enzymes impliquées dans le mécanisme de la O-GlcNAcylation, sont préférentiellement localisées au niveau de la strie Z et de la bande I du sarcomère (Cieniewski-Bernard et al. 2014) (figure 53). De ce fait, de nombreuses protéines sarcomériques vont ainsi être O-GlcNAcylées, c'est le cas de nos deux protéines d'intérêt la desmine et l' α B-cristalline (Cieniewski-Bernard et al. 2004; Deracinois et al. 2018) (figure 54).



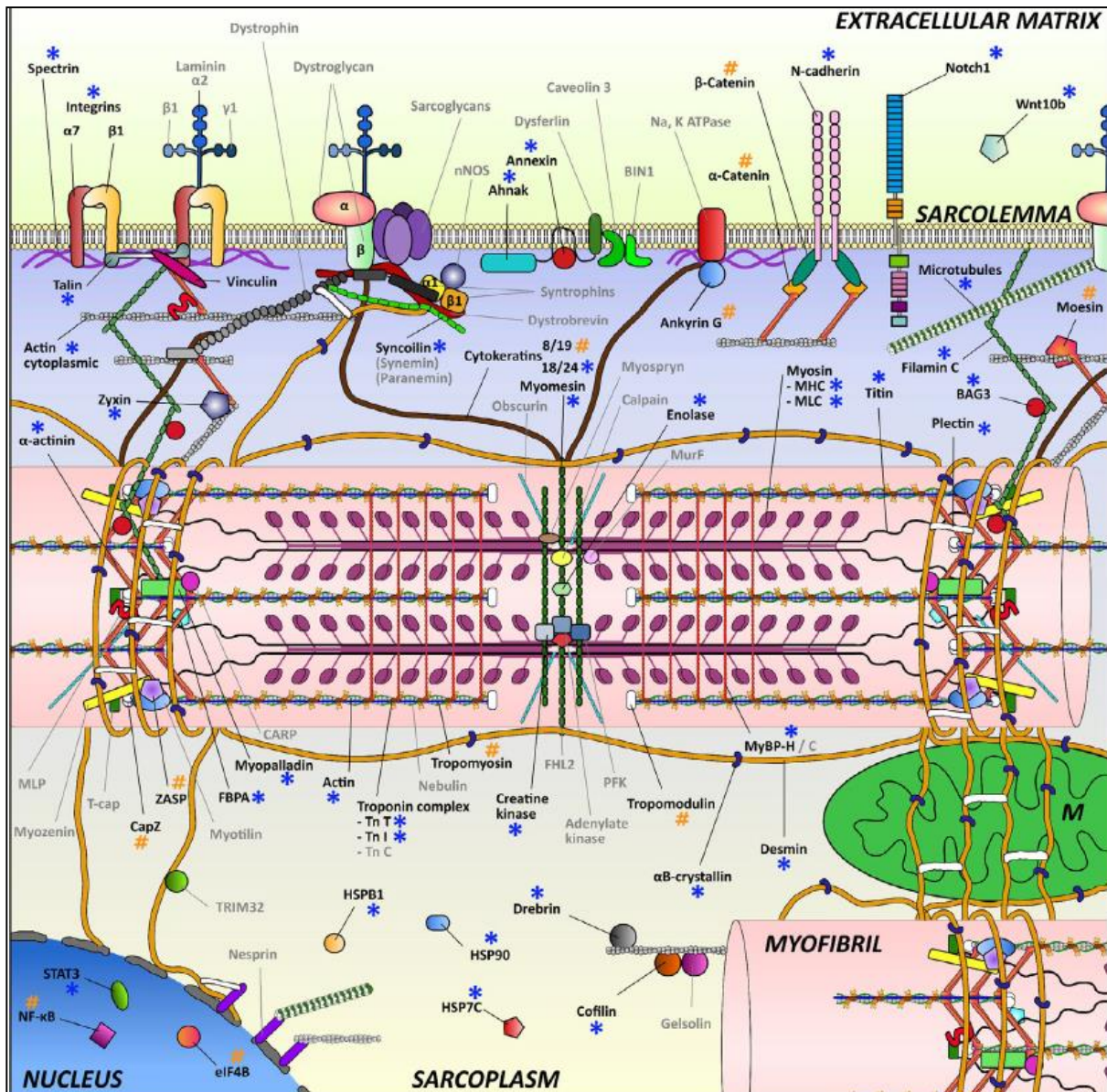


Figure 54 : Représentation schématique des protéines O-GlcNAcylées impliquées dans la physiologie du muscle squelettique. Les protéines marquées du symbole (*) bleu sont O-GlcNAcylées dans les cellules musculaires squelettiques tandis que les protéines portant le symbole (#) orange sont potentiellement O-GlcNAcylées dans le muscle puisqu'elles le sont dans d'autres types cellulaires (Lambert et al., 2019)

A) La O-GlcNAcylation, un médiateur physiologique du muscle squelettique

Cette MPT est alors considérée comme un médiateur physiologique du muscle squelettique puisqu'elle intervient notamment sur le métabolisme musculaire (pour revue, *Lambert et al., 2018*), sur son activité contractile mais également sur sa structure (pour revue *Lambert et al. 2019; Liu et al. 2022*)

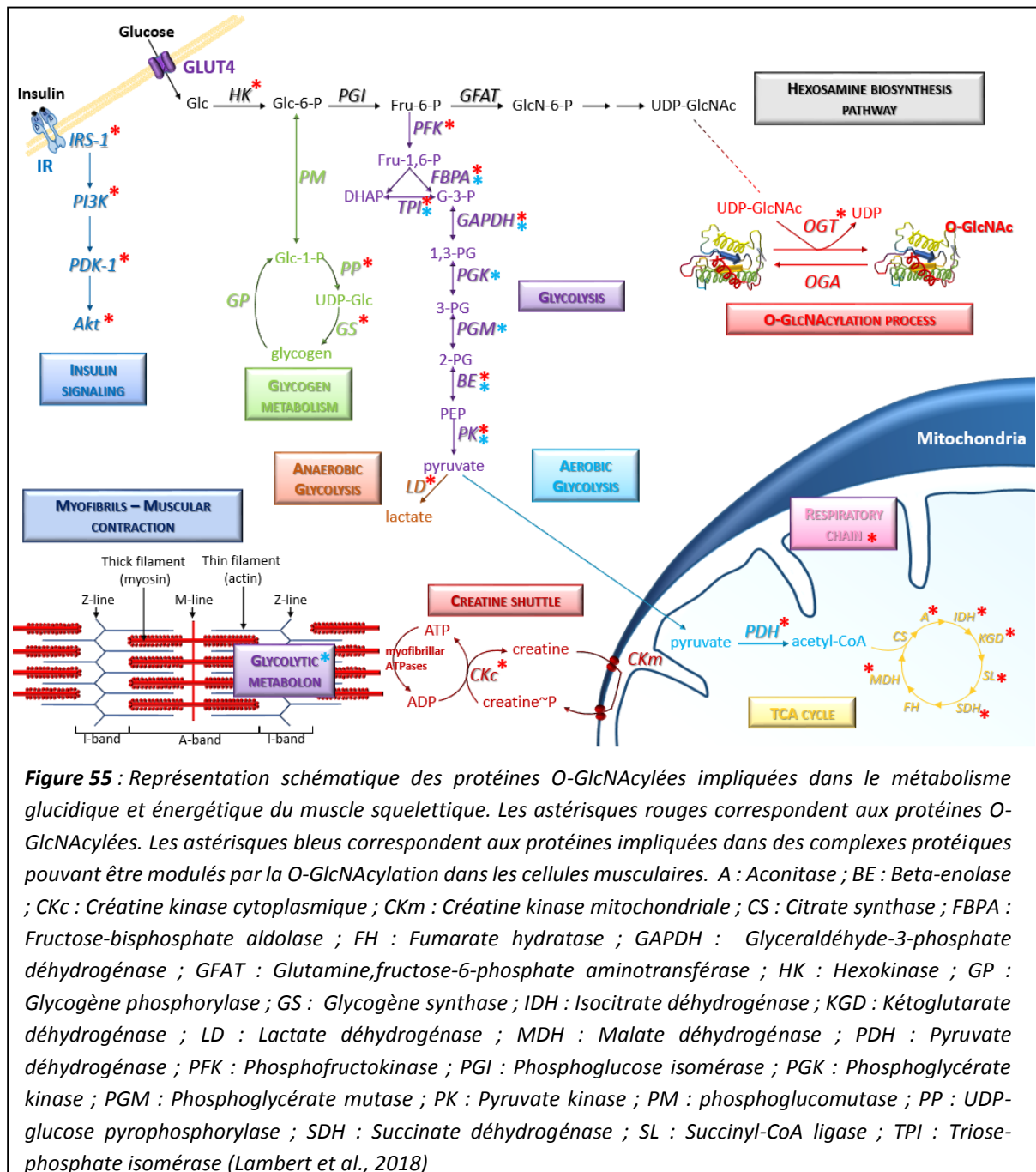
a) Impact sur le métabolisme énergétique

Le muscle squelettique représente un réservoir très important de nutriments tels que le glycogène et les acides aminés. De plus, le muscle squelettique est l'organe le plus demandeur en énergie de l'organisme puisqu'il représente 30% du taux métabolique au repos chez l'Homme ce qui va directement affecter l'homéostasie glucidique (*Ojuka et al., 2012; Hargreaves et Spriet 2020*). De plus, l'apport et l'élimination de glucose sont les facteurs limitants du métabolisme et de l'homéostasie du muscle squelettique (*Santos et al. 2008*). Enfin, ce tissu est également considéré comme l'un des tissus les plus sensibles à l'insuline (*Merz et Thurmond 2020*). En tant que senseur nutritionnel, la O-GlcNAcylation va dépendre de l'état biologique de la cellule, en particulier par son lien avec la voie de biosynthèse des hexosamines. C'est pourquoi, cette MPT va jouer un rôle sur le métabolisme énergétique, en particulier le métabolisme glucidique (*Hortemo et al. 2016*) et sur la sensibilité à l'insuline (*Wang et al. 2016*).

En effet, il a été démontré que GLUT4, le transporteur majoritaire du glucose est modifié et régulé par la O-GlcNAcylation (*Jaldin-Fincati et al. 2017*). En outre, une inhibition de la O-GlcNAcylation entraîne une utilisation facilitée du glucose dans le muscle squelettique induit par l'exercice et impliquant AMPK (*Murata et al. 2018*). De plus, presque toutes les enzymes des voies de signalisation impliquant le glucose sont O-GlcNAcylées (pour revue, *Bacigalupa et al., 2018; Sharma et al., 2018*) (**figure 55**) ce qui pourra réguler leur expression et/ou leur activité (*Lambert et al., 2018*). A titre d'exemple, il a été démontré qu'une inhibition d'OGT et OGA, les enzymes régulatrices de la O-GlcNAcylation, conduit respectivement à une diminution et une augmentation de l'expression de la glucokinase (GK) hépatique ; cette enzyme étant le régulateur majeur du métabolisme du glucose par son rôle dans l'apport intracellulaire de glucose (*Baldini et al. 2016*). Cette MPT joue également un rôle dans la production d'ATP puisque de nombreuses enzymes mitochondriales de la voie aérobie sont O-GlcNAcylées (*Cieniewski-Bernard et al. 2004; Cao et al. 2013; Ma et al. 2016*) (TCA cycle, **figure 55**). Enfin, de nombreuses études suggèrent une relation étroite entre les enzymes du métabolisme énergétique, le sarcomère et la O-GlcNAcylation. C'est le cas de l'enzyme fructose-bisphosphate aldolase (FBPA) connue comme étant O-GlcNAcylée et localisée à la strie Z en association avec l' α -actinine au sein d'un complexe appelé métabolon glycolytique (**figure 55**) (*Rakus et al. 2003; Mamczur*

et al. 2005). De plus, il a été démontré que la O-GlcNAcylation pourrait moduler les interactions protéine – protéine de complexes multiprotéiques tel que ce métabolisme glycolytique (Lambert et al. 2016).

En plus de son implication dans le métabolisme glucidique, la O-GlcNAcylation joue un rôle sur la sensibilité à l'insuline. D'une part puisque que la voie de biosynthèse des hexosamines, dont dépend cette MPT est connue comme étant impliquée dans la résistance à l'insuline induite par l'hyperglycémie (Zhang et al. 2013), d'autre part car un taux élevé d'O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique conduit à l'insulino-résistance (Dai et al. 2018). De plus, l'activité de l'OGT augmente lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur (Kebede et al. 2012). En outre, comme c'était le cas pour les



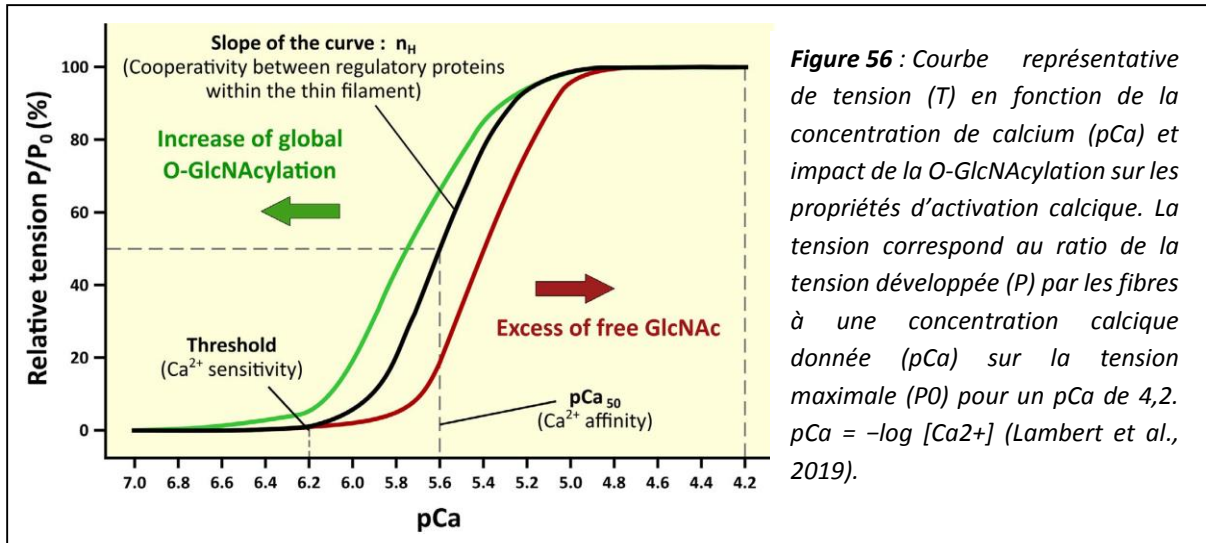
enzymes glycolytiques, les protéines de la voie de signalisation dépendante de l'insuline telles que IRS-1, PI3K, PDK1 ou Akt sont O-GlcNAcylées (Issad et al., 2010; Hart et al. 2011; Yang et Qian 2017) (**figure 55**) ce qui conduit à l'atténuation de la sensibilité et au développement d'une résistance à l'insuline (Arias et al., 2004; Yang et al. 2008; Shi et al. 2018) tout en formant un cercle vicieux et une toxicité pour le glucose (Copeland et al., 2008).

b) Impact sur l'activité contractile

La contraction est la fonction principale du muscle squelettique permettant la génération de force, la production de mouvements et le maintien de la posture. Entre autres processus, cette contraction va impacter l'homéostasie du glucose. En effet, il est connu que l'exercice augmente l'absorption du glucose par le muscle squelettique par translocation de GLUT4 à la membrane *via* la voie de l'AMPK et dans une moindre mesure, la voie insulino-dépendante (Lee et al., 1995; Richter et Hargreaves 2013) ou par l'activation de CamKII grâce au calcium libéré durant la contraction (Ojuka et al., 2012). De plus, il a été démontré qu'un exercice peut moduler le taux d'O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique (Hortemo et al. 2015). Enfin, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la O-GlcNAcylation joue un rôle sur le métabolisme énergétique, cette MPT pourrait donc moduler cette activité contractile *via* la régulation des flux glucidiques.

Outre le lien entre la O-GlcNAcylation et le glucose pour moduler la contraction, il semblerait que cette régulation passe également par des changements de propriétés d'activation calcique du sarcomère (Hedou et al. 2007; Cieniewski-Bernard et al. 2009; 2012; 2014). Ces paramètres peuvent être définis en analysant la courbe T/pCa correspondant la tension relative développée par les fibres musculaires en fonction de la concentration de calcium. En effet, cette courbe permet ainsi d'analyser quatre paramètres (Kischel et al. 2000; Lambert et al. 2019) (**figure 56**) :

- la sensibilité au calcium du sarcomère grâce au seuil de calcium permettent l'activation de la tension des fibres (pCa)
- l'affinité du sarcomère pour le calcium lorsque 50% de la tension maximale est développée (pCa50)
- la coopérativité entre les différentes protéines régulatrices (troponines / tropomyosines) à partir de la pente de la courbe (coefficient de Hill n_H)
- la tension maximale P_0 développée par la fibre en concentration saturante en calcium (pCa 4,2)



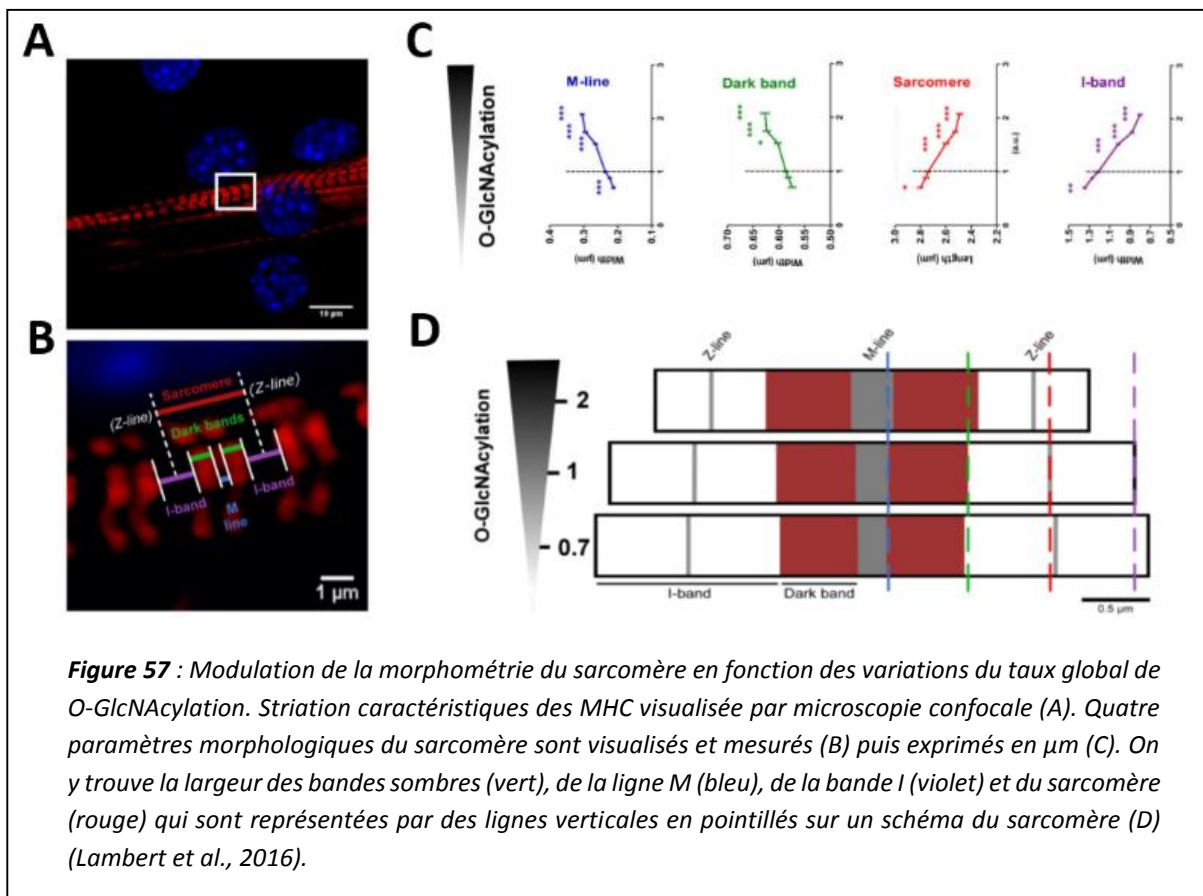
Enfin, de nombreuses protéines contractiles et régulatrices sont connues comme étant O-GlcNAcylées, c'est le cas de l'actine, la myosine, MLC, MHC, la tropomyosine et les troponines (Ramirez-Correa et al. 2008; Stevens et al. 2013; Akimoto et al. 2019; Lambert et al. 2019). Des changements d'O-GlcNAcylation de ces protéines pourraient alors réguler leur activité et moduler les paramètres énoncés précédemment. Il a ainsi été démontré qu'une augmentation d'O-GlcNAcylation de la MHC, de l'actine et de la tropomyosine cardiaques de souris diabétiques induirait une diminution de la sensibilité au calcium du sarcomère (Ramirez-Correa et al. 2015). Cette diminution de sensibilité serait associée à une diminution de l'affinité du sarcomère pour le calcium et une augmentation d'O-GlcNAcylation des protéines MHC, MLC et de l'actine lorsque des fibres seraient exposées à la GlcNAc (Hédou et al. 2009). Bien qu'encore mal comprise, la régulation de propriétés contractiles du muscle squelettique par la O-GlcNAcylation proviendrait de changements d'interactions protéine – protéine ou bien d'une dynamique avec la phosphorylation (Liu et al. 2022).

c) Impact sur la structure du muscle

Comme nous l'avons vu au début de cette introduction (*partie 1 : le muscle squelettique*), le muscle squelettique présente une organisation complexe lui permettant d'assurer correctement ses différentes fonctions. Cette structure semi-cristalline est due à l'assemblage de nombreuses protéines permettant un arrangement très précis et régulier des sarcomères mais dans une plus large mesure des myofibrilles. Outre les nombreuses protéines et enzymes impliquées dans le métabolisme et dans la contraction évoquées dans les paragraphes précédents, de nombreuses protéines de structure sont aussi O-GlcNAcylées (**figure 54**) ; parmi elles l'actinine, la titine, ZASP (Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif), la filamine C, la myoméline, la myopalladine, la plectine, BAG3 (BCL2 Associated Athanogene

3) et la desmine, notre protéine d'intérêt (Cieniewski-Bernard et al. 2012; Leung et al. 2013). Certaines de ces protéines vont être au cœur de complexes multiprotéiques formant le cytosquelette sarcomérique essentiel au maintien de la structure du muscle (Henderson et al. 2017). Ces interactions protéine – protéine vont principalement se situer au niveau de structure dynamique des sarcomères : la strie Z, la ligne M et la bande I (Wang et al. 2021). D'autres protéines essentielles à la structure du muscle sont également connues comme étant modifiées par la O-GlcNAcylation telles que la cytokératine, la laminine, la spectrine, les intégrines, la vinculine ou bien l' α B-cristalline, le chaperon moléculaire de la desmine (**figure 54**) (Ahmad et al. 2006; von Nandelstadh et al. 2009; Laczy et al. 2010; Lambert et al. 2016). Puisque cette MPT semble toucher un très grand nombre de protéines structurales, elle pourrait être grandement impliquée dans les modulations de l'architecture du sarcomère et du muscle tout entier (pour revue, (Lambert et al. 2019; Liu et al. 2022).

Il est connu que la phosphorylation régule les interactions protéine – protéine du sarcomère ; sa dynamique avec la O-GlcNAcylation pourrait alors affecter la structure du muscle en particulier au niveau de la strie Z (Obermann et al. 1997; von Nandelstadh et al. 2009; Sadikot et al., 2010; Deracinois et al. 2018). De plus, il a été démontré qu'une augmentation globale de la O-GlcNAcylation entraîne une augmentation de la largeur de la bande A et de la ligne M alors que celle de la bande I et le sarcomère diminue (Lambert et al. 2016) (**figure 57**). C'est pourquoi la O-GlcNAcylation serait un médiateur de la structure sarcomérique. C'est dans ce sens qu'il a été démontré que la titine, protéine essentielle au maintien de l'architecture du muscle, présente de multiples sites d'O-GlcNAcylation (Deracinois et al. 2018; Sziklai et al. 2022). Ces sites sont situés dans des régions clés de l'assemblage du sarcomère qui permettent également d'assister la polymérisation de la myosine (Kontrogianni-Konstantopoulos et al. 2009; Y. Li et al., 2016). En parallèle, la MHC est également O-GlcNAcyliée au niveau de sites adjacents à son domaine de polymérisation et d'interaction avec la myosine et la titine (Hédou et al. 2009). De plus, des sites d'O-GlcNAcylation ont également été identifiés dans le domaine PxxP de BAG3 et dans le domaine de répétition plakine de la plectine respectivement lié à l'interaction avec les protéines contenant des domaines SH3 et les protéines des filaments intermédiaires (Deracinois et al. 2018). Ces différentes études tendent à démontrer que la O-GlcNAcylation toucherait des domaines spécifiques de protéines structurales connus pour réguler les interactions protéiques et ainsi moduler l'architecture du sarcomère.

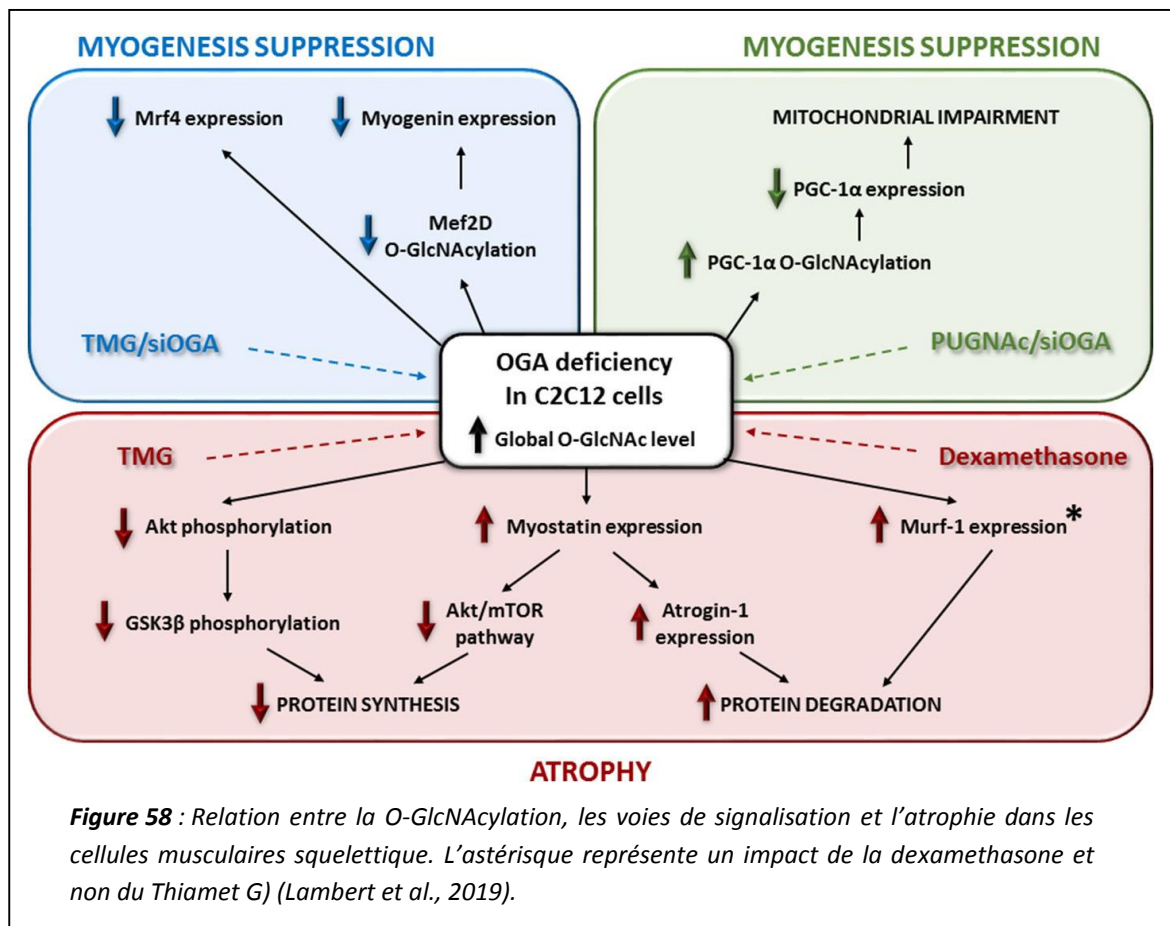


d) Rôle dans l'atrophie musculaire et certaines pathologies

En plus de son implication dans les divers processus énoncés précédemment, la O-GlcNAcylation peut être impliquée dans les processus de plasticité et dans le développement de l'atrophie musculaire qui est caractérisée par un défaut de la balance entre la synthèse et la dégradation protéique (Bonaldo et Sandri 2013; Schiaffino et al. 2013). Ces deux mécanismes cellulaires qui permettent le maintien de l'homéostasie protéique pourrait potentiellement être modulés par la O-GlcNAcylation (Zhang et al. 2003; Ruan et al., 2013).

Il a été démontré que la O-GlcNAcylation était associée à l'atrophie dans des muscles de rats immobilisés (Cieniewski-Bernard et al. 2004; 2006; 2014) mais que son impact était différent selon le type de muscle. En effet, une diminution du taux global d'O-GlcNAcylation était observée dans des fibres lentes du muscle soléaire alors qu'il n'était pas modifié dans les fibres rapides du muscle EDL (Cieniewski-Bernard et al. 2006). De plus, il existait également un effet opposé de l'activité de l'OGT puisqu'elle diminuait dans le soléaire et augmentait dans l'EDL.

D'autres études se sont intéressées au lien entre la O-GlcNAcylation et les voies de signalisation anaboliques et cataboliques impliquées dans l'atrophie (**figure 58**). Il a ainsi été démontré qu'une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation diminuait la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β ainsi qu'une augmentation de l'expression de la myostatine pouvant conduire à une inhibition de certaines voies anaboliques tandis que certaines voies cataboliques pourraient être améliorées par l'augmentation de l'expression de l'atrogine-1 (*Massaccesi et al. 2016*). De plus, cette augmentation semble supprimer la différenciation myogénique des cellules musculaires (*Ogawa et al. 2012; 2013; Wang et al. 2016*) puisque l'expression de Mrf4, de la myogénine et de MyoD est diminuée (*Ogawa et al. 2012; Wang et al. 2016*) (**figure 58**). A l'inverse une diminution du taux global d'O-GlcNAcylation provoque une augmentation de l'expression de Murf-1 impliqué dans l'atrophie (*Massaccesi et al. 2016*) et une dégradation de PGC-1 α ce qui conduit à la suppression de la biogénèse mitochondriale et de la myogenèse (*Wang et al. 2016*) (**figure 58**).



Enfin, il semblerait que cette MPT soit impliquée dans certaines pathologies neuromusculaires. En effet, en comparaison aux fibres musculaires normales, la O-GlcNAcylation semble relocalisée du sarcolemme au cytoplasme et aux noyaux dans des fibres musculaires de dystrophies, de rhabdomyolyse ou d'amyotrophie (*Nakamura et al. 2012; Dang et al. 2022*).

B) O-GlcNAcylation de la desmine et de l'αB-cristalline

Comme nous l'avons vu, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de la O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique démontrant que cette MPT était un médiateur physiologique très important pour ce tissu. Cependant, il existe à ce jour peu de données concernant l'impact de cette MPT sur les propriétés de nos deux protéines d'intérêt.

Nous savons en revanche, qu'il existe un site d'O-GlcNAcylation de la desmine sur sa sérine 460 dans son domaine C-terminal (*Deracinois et al. 2018*) (**figure 50**). Bien que cette MPT soit impliquée dans l'organisation et la réorganisation du cytosquelette sarcomérique notamment via la modulation de l'interaction entre la desmine et son chaperon moléculaire (*Lambert et al. 2016*), son rôle précis n'a pas encore été établi. En revanche, il a été démontré que la O-GlcNAcylation module le niveau de phosphorylation des FI (*Farach et Galileo 2008; Slawson et al. 2008*) et augmente la solubilité des kératines (*Srikanth et al., 2010; Rotty et al., 2010*) ainsi que l'ubiquitination et la dégradation des protéines des FI par le protéasome (*Ruan et al., 2013*). Il est alors légitime de considérer que la O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle clé dans la régulation du réseau de desmine.

Il a également été décrit que l'αB-cristalline est touchée par la O-GlcNAcylation dans les muscles cardiaque et squelettique (*Roquemore et al. 1996; Cieniewski-Bernard et al. 2004*). Son site d'O-GlcNAcylation se trouve dans sa partie C-terminale, sur la thréonine 170 chez l'Homme et le rat et sur la thréonine 162 des cellules musculaires de souris (*Roquemore et al. 1996; Deracinois et al. 2018*) (**figure 51**). Dans ces cellules, cette MTP est impliquée dans le remodelage du cytosquelette sarcomérique via la modulation des interactions des protéines et de leurs partenaires (*Lambert et al. 2016*) puisque la O-GlcNAcylation est connue comme pouvant modifier ces interactions (*Yu et al. 2012; Tarbet et al., 2018*).

Dans les cardiomyocytes, l'αB-cristalline est O-GlcNAcyllée en particulier lors d'un stress cellulaire (*Krishnamoorthy et al., 2013*) entraînant des changements de sa localisation cellulaire mais également sa sécrétion au sein d'exosomes (*Kore et Abraham 2016*). Elle pourrait ainsi être transloquée au cytosquelette afin d'assurer un rôle de cytoprotection (*Krishnamoorthy et al., 2013*). Alors que la O-GlcNAcylation affecte autant l'αB-cristalline phosphorylée que non phosphorylée (*Roquemore et al. 1996*), le mutant T170A présente une phosphorylation plus importante de la sérine 45 et 59 que l'αB-cristalline native suggérant qu'un défaut d'O-GlcNAcylation de la protéine puisse augmenter sa phosphorylation (*Krishnamoorthy et al., 2013*). Outre son implication dans les interactions protéine – protéine et la translocation, cette MTP pourrait également agir sur l'activité de la chaperonne (*Balana et al., 2021*).

IV) Modification des MPT et physiopathologie des troubles musculaires

Il s'avère que nos deux protéines d'intérêt peuvent être anormalement ou excessivement modifiées au détriment des conditions physiologiques de l'organisme.

A) La desmine

En effet, la desmine peut être la cible de processus non enzymatiques comme la glycation (AGE : advanced glycation end) dans les cardiomyopathies (*Diguet et al. 2011*). De plus, le stress oxydatif peut également fortement impacter la desmine conduisant à une réorganisation du cytosquelette et une agrégation (*Ahmed et al. 2016; Datta et al. 2017*) ; en ce sens, il a été démontré que la desmine est oxydée et nitrée au sein des agrégats protéiques (*Janué et al. 2007a; 2007b*). De manière intéressante, un traitement antioxydant empêche son agrégation dans des modèles cellulaires pathologiques soumis à divers stress (*Segard et al. 2013*). Il est alors suggéré que ces modifications aberrantes de la desmine ne lui permettent plus d'être conduite au système ubiquitine-protéasome en vue d'être dégradée lorsqu'elle est mal conformée ce qui entraîne, à termes, la formation d'agrégats protéiques (*Ferrer et Olivé 2008*). A l'inverse, une phosphorylation anormale de la protéine TRIM32 provoque une dérégulation de l'ubiquitinylation de la desmine entraînant sa dégradation par la calpaïne-1 et est impliquée dans la physiopathologie de l'atrophie musculaire squelettique (*Cohen et al. 2012; Aweida et al. 2018; Cohen 2020*). Dans ce sens, il a été démontré que la phosphorylation de la sérine 32 de la desmine par GSK-3 β , active lors d'un jeûne, est le premier mécanisme de la dégradation des FI lors de l'atrophie (*Mirzoev et al., 2021*).

Alors que certaines mutations de la desmine associées aux myopathies correspondent à des sites de phosphorylation tels que S6F ou S12F dans la tête N-terminale (*Capetanaki et al. 2015*), une phosphorylation anormale de la desmine est liée à différentes pathologies cardiaques (*Diguet et al. 2011; Agnetti et al. 2014*). Les formes phosphorylées de la desmine pourrait alors servir de marqueurs tissulaires de l'insuffisance cardiaque. De plus, une augmentation de la phosphorylation impliquant la sérine 32 serait liée à un clivage de la protéine par les calpaïnes et les caspases et une agrégation de la desmine (*Bouvet et al. 2016; Mercier et al. 2018*). Pour rappel, la sérine 32 est également une cible des kinases dépendantes des cyclines (CDK : cyclin dependant kinases) (*Makihara et al. 2016; Giovarelli et al. 2020*). De manière intéressante, une surexpression de ces dernières ainsi que d'autres kinases est observée dans des biopsies de patients atteints de myopathies myofibrillaires (*Nakano et al. 1997; Wanschit et al. 2002; Vattelemi et al. 2004*). De plus, il existe une augmentation de l'activité de la PKC dans un modèle animal de cardiomyopathie (*Huang et al. 2002*). Enfin, il existe une hyperphosphorylation de la desmine dans le cadre de certaines desminopathies (*Caron et Chapon*

1999). Ces différentes données suggèrent qu'une hyperphosphorylation de la desmine et un désassemblage des FI seraient impliqués dans la pathogénèse des myopathies liées à la desmine.

Alors que la phosphorylation de la desmine est largement impliquée dans les processus physiopathologiques des troubles musculaires, le rôle de la O-GlcNAcylation est encore mal compris. Cependant, le site de O-GlcNAcylation de la desmine correspond à un site muté dans les myopathies myofibrillaires (Bär *et al.* 2007; Clemen *et al.* 2013). De plus, dans l'insuffisance cardiaque, des données montrent que la dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la desmine augmente lorsque la O-GlcNAcylation globale diminue (Mercier *et al.* 2018). L'ensemble de ces données supportent donc le fait qu'un défaut d'O-GlcNAcylation de la desmine pourrait être impliqué dans la physiopathologie de certaines maladies musculaires ; il serait donc intéressant de déterminer si la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la desmine sont modifiées dans différentes pathologies des muscles squelettique et cardiaque.

B) L'αB-cristalline

Comme nous l'avons vu précédemment, l'αB-cristalline est impliquée dans de nombreuses pathologies, en particulier celles présentant une agrégation anormale des protéines. Une dysfonction de la chaperonne est largement liée à la physiopathologie de nombreux troubles cardiovasculaires, neurodégénératifs, inflammatoires, mais également des cancers et des cardiomyopathies dilatées ou liées à la desmine (Garrido *et al.* 2012; Boncoraglio *et al.*, 2012; Anbarasu *et Sivakumar* 2016). Il a également été établi que l'expression et/ou la localisation subcellulaire des petites protéines de choc thermique (sHSP) sont modifiées chez plusieurs pathologies musculaires telles que la myopathie distale à vacuoles bordées, les myopathies congénitales, les dystrophinopathies et les myopathies myofibrillaires (Fischer *et al.* 2013; Brinkmeier *et Ohlendieck* 2014; Unger *et al.* 2017; Fischer *et al.* 2021). De plus, de nombreuses mutations de l'αB-cristalline sont identifiées dans des pathologies touchant les muscles cardiaque et squelettiques (Vicart *et al.* 1998; Selcen *et Engel* 2003; Inagaki *et al.* 2006; Dimauro *et al.* 2018; Tedesco *et al.* 2022). Ces pathologies en lien avec ces mutations sont appelées des αB-crystallinopathies et présentent les mêmes caractéristiques et marqueurs que les myopathies myofibrillaires à savoir : une agrégation protéique incluant la desmine et l'αB-cristalline, une désorganisation des myofibrilles et la présence de vacuoles (Schröder *et Schoser* 2009; Claeys *et Fardeau* 2013; Dimauro *et al.* 2018).

La mutation R120G de l'αB-cristalline est la plus étudiée et est présente dans une myopathie liée à la desmine (Vicart *et al.* 1998). Lors de cette mutation, toutes les fonctions protectives de l'αB-cristalline native sont perdues, les FI de desmine sont touchés, s'agrègent, ce qui entraîne une

altération de l'alignement des myofibrilles (Chávez Zobel et al. 2003; Perng et al. 2004). Cela conduit à une faiblesse des muscles des membres, du cou, du tronc, de la face et à un dysfonctionnement cardiaque qui entraîne une cardiomyopathie (Vicart et al. 1998; Goldfarb et al. 2008). Il semblerait que la phosphorylation ait un grand rôle à jouer dans ce processus. En effet, le mutant R120G est hyperphosphorylé, ce qui induit un changement de son interaction avec d'autres HSP. De plus, il est connu que l' α B-cristalline est hyperphosphorylée dans le cadre de certaines pathologies et que cette MPT modulerait son activité de chaperonne (gain ou perte de fonction), son oligomérisation et/ou sa distribution cellulaire (Sarparanta et al. 2020; Boncoraglio et al., 2012; Tedesco et al. 2022). L'hyperphosphorylation de l' α B-cristalline apparaîtrait alors comme un mécanisme de pathogénicité du mutant (Simon et al. 2007; 2013). Cependant, bien que la phosphorylation de l'HSP27 soit proposée comme étant un outil de diagnostic pour différencier les desminopathies des myopathies myofibrillaires, aucun changement de phosphorylation n'a été observé chez les patients atteints d' α B-cristallinopathies (Clemen et al. 2005).

C) Cas des desminopathies

Les desminopathies sont des pathologies multifactorielles faisant partie de la famille des myopathies myofibrillaires (Perng et al. 2004) caractérisées par une désorganisation marquée de la morphométrie myofibrillaire, une altération de la fonction mitochondriale (**figure 59**), une dysfonction de la voie de l'autophagie et du système de dégradation ubiquitine-protéasome, conduisant *in fine* à l'apparition d'agrégats protéiques délétères pour la cellule musculaire (Vicart et al. 1998; Yassemi Capetanaki et al. 2015). Ces différentes atteintes vont entraîner à termes une faiblesse et de sévères dysfonctions musculaires (Claeys et Fardeau 2013). Bien que les caractéristiques générales soient connues, ces pathologies vont présenter des phénotypes très variés. En effet, elles résultent la plupart du temps d'une mutation de séquence du gène ou d'un clivage de la desmine qui peut avoir des conséquences plus ou moins dramatiques d'un individu à l'autre. Il est alors très complexe de mettre

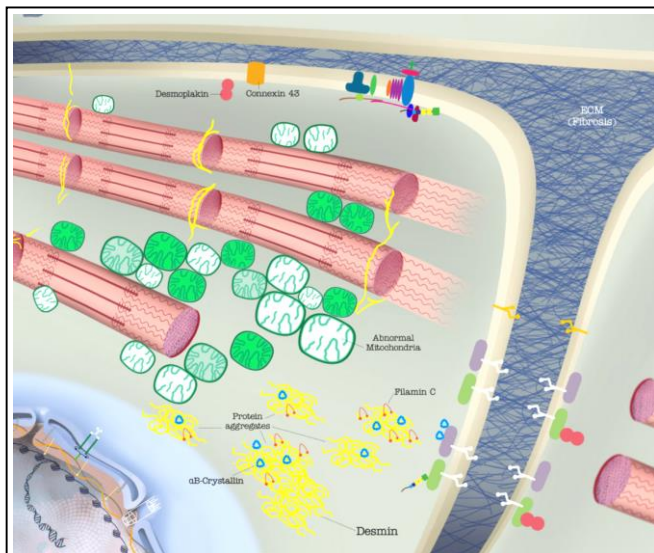
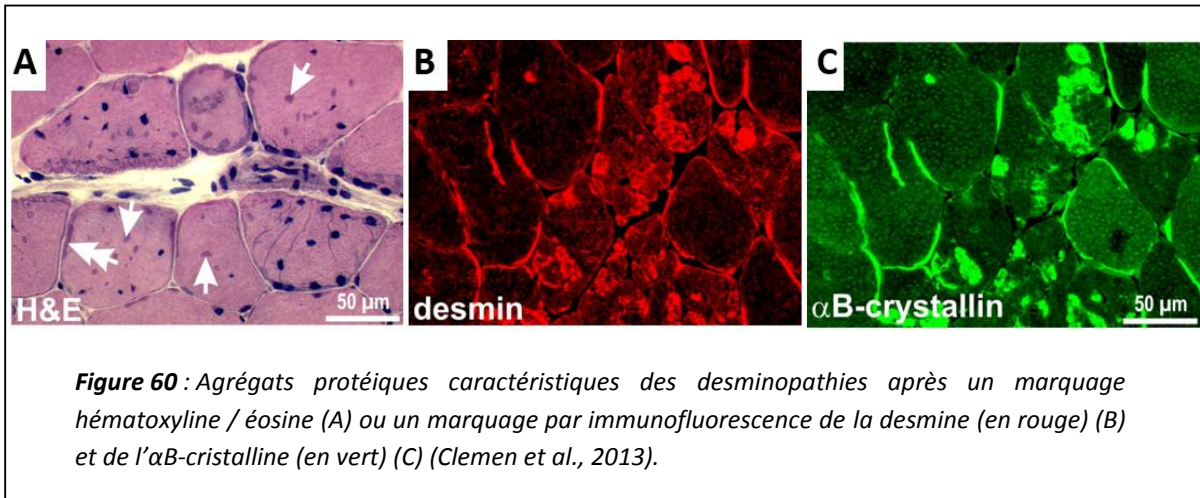


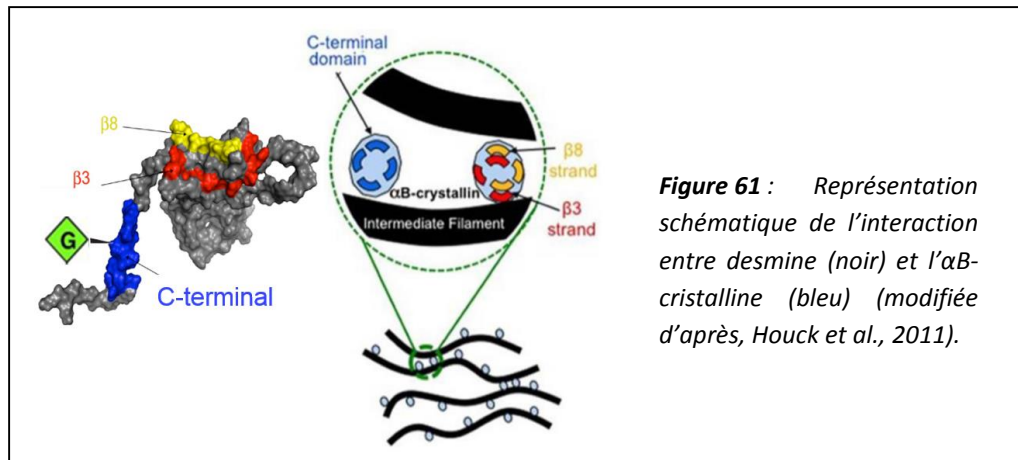
Figure 59 : Représentation schématique de la structure des filaments intermédiaires de desmine (jaune) associés à leurs partenaires protéiques, en particulier l' α B-cristalline dans le cas de desminopathies (Capetanaki et al., 2007).

au point une thérapie efficace, c'est pourquoi il n'existe à ce jour aucun traitement disponible pour les patients atteints de ces pathologies. Cependant, puisque les MPT jouent un rôle sur de nombreux paramètres du muscle squelettique, elles pourraient être une piste non négligeable.



En effet, il a été démontré que des changements de phosphorylation ou de dérégulation des kinases de la desmine, principal composant des FI, étaient associés aux desminopathies (Clemen et al. 2013; Capetanaki et al. 2015; Tsikitis et al. 2018). De plus, son site d'O-GlcNAcylation sur sa sérine 460 (Cieniewski-Bernard et al. 2012; Deracinois et al. 2018) est connu comme étant en lien avec l'apparition de desminopathies avec désorganisation myofibrillaire et présence d'agrégats protéiques (Bär et al. 2007; Clemen et al. 2013) (**figure 60A**). Au sein de ces agrégats, on retrouve la desmine mais également son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline (Maerkens et al. 2013; Capetanaki et al. 2015) (**figure 60B et C**). L'hyperphosphorylation de cette dernière sur ses sérines 19, 45 et 59, sites fondamentaux pour son activité en réponse à l'agrégation, a été démontrée comme cruciale dans ces pathologies (Bakthisaran et al. 2016). Par ailleurs, l' α B-cristalline est également O-GlcNAcylée, en particulier lors d'un stress cellulaire (Krishnamoorthy et al., 2013). Son site d'O-GlcNAcylation se trouve dans sa partie C-terminale (Roquemore et al. 1996; Deracinois et al. 2018), dans un des sites d'interaction privilégié avec la desmine (Krishnamoorthy et al., 2013; Kore et Abraham 2016) (**figure 61**). De plus, des données du laboratoire supportent le rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation de cette interaction (Lambert et al. 2016). Pour rappel, l'un des rôles majeurs de l' α B-cristalline est de stabiliser, soutenir et prévenir l'agrégation des FI de desmine (Costa et al. 2004), ces derniers étant les garants de l'intégrité du muscle squelettique (Hnia et al. 2015). De manière intéressante, un lien a été démontré entre la O-GlcNAcylation et certaines pathologies neuromusculaires telles que l'amyotrophie spinale de type I, la polymyosite, la dermatomyosite, la myosite à inclusions sporadiques, les dystrophies musculaires, l'atrophie musculaire neurogène, la rhabdomyolyse et les myopathies distales avec

vacuoles bordées (Nakamura *et al.* 2012) et que cette MPT pourrait également être impliquée dans l'atrophie des muscles squelettiques (Cieniewski-Bernard *et al.* 2006).



Toutes ces données suggèrent que phosphorylation et O-GlcNAcylation pourraient agir ensemble au niveau de la desmine et de son chaperon selon une certaine dynamique afin de rétablir les désordres observés dans le cadre des desminopathies. En effet, tandis que la phosphorylation pourrait jouer un rôle sur la prise en charge par l'αB-cristalline des agrégats délétères pour la cellule (Antonioni *et al.* 2020), la O-GlcNAcylation, connue pour moduler certaines interactions protéiques (Myers *et al.* 2016), pourrait également moduler l'interaction entre les deux protéines afin de réguler la structure des FI de desmine et la morphométrie sarcomérique (Lambert *et al.* 2016). De plus, cette interaction serait modifiée dans le cas des desminopathies (Goldfarb *et Dalakas* 2009). Cela suggère que ces deux MPT pourraient alors être des acteurs majeurs de l'organisation et la réorganisation du cytosquelette sarcomérique dans le cadre de ces pathologies. De plus, Wei Yan et collaborateurs ont démontré récemment qu'une diminution de la O-GlcNAcylation dans le cadre de cancer induisait des changements de concentration de calcium intracellulaire, provoquant à une augmentation d'activation de protéase et un clivage des FI de desmine. Ces FI ainsi clivés ne pouvant plus permettre l'alignement structural des myofibrilles, le maintien de l'architecture du muscle n'était donc plus assuré par la desmine entraînant des problèmes de contraction musculaire (Yan *et al.* 2022). Ces travaux ont ainsi permis de démontrer le lien entre la O-GlcNAcylation, l'homéostasie protéique et la contraction musculaire dans un modèle de souris cancéreuses.

Bien que les recherches sur la O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique se sont multipliées ces dernières années, son rôle et sa dynamique complexe avec la phosphorylation sont encore mal compris et nécessitent d'être élucidés. En particulier, leur impact sur la structure globale de la cellule musculaire et les fonctions du muscle squelettique sont encore une énigme qu'il est nécessaire de déchiffrer.

PROBLEMATIQUE

La desmine est une protéine clé des filaments intermédiaires de type III du muscle. Dans les muscles striés, les FI de desmine constituent un réseau cytosquelettique interconnecté et hautement régulé dont la fonction est de maintenir la cyto-architecture du muscle, essentielle pour assurer un travail efficace du sarcomère (Paulin et Li 2004). En plus de son rôle clé dans l'arrangement et l'interaction des myofibrilles, la desmine et ses partenaires protéiques contribuent à la localisation subcellulaire d'organelles tels que les noyaux ou les mitochondries. Les interactions moléculaires entre la desmine et ses partenaires protéiques sont à l'origine du maintien de la cytoarchitecture du muscle squelettique et sont en partie modulées par les modifications post-traductionnelles (MPT) (Winter et al. 2014). Parmi elles, on trouve la phosphorylation, l'ubiquitination et bien d'autres. La desmine est également touchée par la O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique plus proche de la phosphorylation que des glycosylations classiques et avec qui elle partage un lien complexe et dynamique. Cette MPT est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, la différenciation, l'autophagie, la régulation du cycle cellulaire. Outre ses nombreuses fonctions cellulaires, il est connu que la O-GlcNAcylation module l'interaction protéique (Myers et al. 2016). Dans les cellules musculaires squelettiques, différents indices laissent à penser que la O-GlcNAcylation serait impliquée dans la modulation de la morphométrie sarcomérique, notamment *via* la modulation d'interaction protéine-protéine régulant la structure du sarcomère, en particulier l'interaction desmine / α B-cristalline (Lambert et al. 2016). Cependant, l'implication de cette MPT ainsi que sa dynamique avec la phosphorylation dans la régulation de ces interactions et de l'architecture du muscle squelettique est encore mal comprise.

Ainsi, l'objectif principal de mes travaux de thèse a été de déterminer si la O-GlcNAcylation pourrait être à l'origine de modification des propriétés de la desmine pouvant conduire à un changement d'interaction avec ses partenaires protéiques et donc un remodelage du cytosquelette sarcomérique dans le muscle squelettique. En particulier, dans un modèle de cellules musculaires de type C2C12, des composés pharmacologiques tels que le Ac₄-5S-GlcNAc, un inhibiteur de l'OGT (Gloster et al. 2011) et le Thiamet G, un inhibiteur de l'OGA (Vocadlo 2012) ont été appliqués afin de diminuer et d'augmenter le taux global d'O-GlcNAcylation respectivement. L'expression et la distribution subcellulaire de la desmine au sein de différents compartiments seront investiguées ainsi que ses MPT et leur dynamique et ce, par des approches biochimiques et électrophorétiques classiques. En parallèle, les mêmes analyses ont été effectuées sur le chaperon de la desmine, l' α B-cristalline. L'organisation et la réorganisation des filaments intermédiaires de desmine seront également investiguées par immunofluorescence et microscopie confocale. Enfin, étant donné que la desmine est un point nodal du cytosquelette sarcomérique qui permet le maintien de l'organisation semi-cristalline du muscle squelettique, en particulier par son interaction avec de nombreuses protéines au sein d'un

interactome complexe (*Hnia et al. 2015*), l'impact de la O-GlcNAcylation sur cet interactome sera également étudié à l'aide d'une approche protéomique différentielle.

L'ensemble des données présentées précédemment indiquent que les MPT, en particulier la O-GlcNAcylation, seraient des modulateurs importants de la structure et de la fonction du muscle squelettique. En revanche, leur dynamique qui est très complexe étant donné le nombre de sites modifiés, nécessite d'être étudiée de manière plus approfondie. La compréhension de ces mécanismes de régulation par le biais de ces travaux de thèse pourrait également apporter de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre la physiopathologie de certaines maladies musculaires, telles que l'atrophie musculaire ou les desminopathies.

MATERIEL ET METHODES

I) Culture cellulaire

L'ensemble de ces travaux est effectué sur des cellules musculaires squelettiques murines de la lignée cellulaire C2C12 (ATCC : American Type Culture Collection) différenciées en myotubes. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, 5% de dioxyde de carbone et humidité saturée.

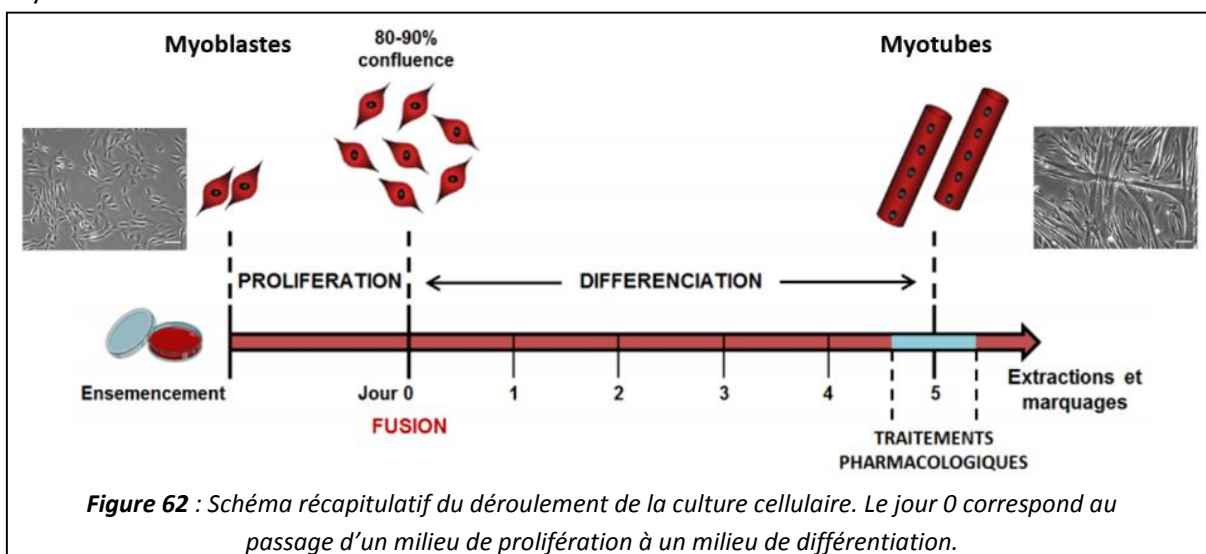
A) Prolifération cellulaire

La culture des myoblastes C2C12 s'effectue dans des flasques de 75 cm² dans un milieu de prolifération (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ; 10% de sérum de veau foetal (SVF : Gibco) ; 1% d'antibiotiques/antimycotiques (Sigma)). Le changement de milieu est effectué tous les deux jours.

B) Ensemencement et différenciation des cellules

Lorsque les cellules atteignent 80-90% de confluence, les flasques sont rincées par le milieu de division (DMEM, 25 mM HEPES, 1g/L glucose), puis les cellules sont décollées des flasques à l'aide de la trypsine ajoutée à une concentration de 0,25% dans le milieu de division additionné de 0,5 mM EDTA pendant quelques minutes. Après comptage sur cellule de Malassez, les cellules sont ensemencées dans du milieu de prolifération dans des boîtes de Pétri de 11.7 cm² à raison de 200000 cellules/ml (2 ml/boîte).

Quand les cellules sont confluentes à 80-90%, le milieu de prolifération est changé au profit d'un milieu de différenciation (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ; 2% de sérum de cheval inactivé par la chaleur (Gibco) ; 1% d'antibiotiques/antimycotiques (Sigma)). Ce changement de milieu correspond au jour 0 de différenciation (**figure 62**). Les myoblastes vont alors fusionner et se différencier en myotubes



C) Traitement des cellules

Au 5^e jour de différenciation, les myotubes sont traités par différents agents pharmacologiques ajoutés dans le milieu de fusion et appliqués pendant la nuit (**figure 62**). Nous utilisons 5 μM de Ac₄-5S-GlcNAc (peracetyl-5-thio-GlcNAc) (*Gloster et al. 2011*) ou 0,5 μM de Thiamet G (thiazoline amino-ethyl gluco-configured) (*Vocadlo 2012*) resolubilisés dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) afin d'inhiber l'OGT et l'OGA respectivement. Les cellules témoins correspondent aux myotubes exposés au DMSO pendant la nuit. Afin d'augmenter et de diminuer l'activité de CamKII, nous appliquons 3 mM de caféine (*Schnuck et al. 2018*) et un co-traitement par 3 mM de caféine couplée à 20 μM de KN-93 (*L. Gao, Blair, et Marshall 2006*) resolubilisés dans l'eau.

II) Dosage de la viabilité cellulaire

Les cellules sont cultivées de la même manière que précédemment (*voir paragraphe 1 : culture cellulaire*) mais dans une plaque 96 puits à raison de 100000 cellules/ml (200 μl /puits). A la suite des traitements, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées à deux reprises par du PBS (Phosphate Buffer Saline) à 37°C. Ensuite, 100 μl de MTT ((3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) dissous dans le PBS à raison de 0,5 mg/ml sont ajoutés pendant 3 heures à 37°C et humidité saturée. Ce dosage colorimétrique se base sur la réduction du MTT, un sel jaune en cristal de formazan de couleur violette en présence de cellules métaboliquement actives (*Kumar, Nagarajan, et Uchil 2018*). Enfin, le MTT est éliminé et les sels de formazan sont resolubilisés par 100 μl de DMSO, puis la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à l'aide du lecteur SpectraMax (Molecular devices) à 570 nm après agitation.

III) Protocole de marquage

Les myoblastes sontensemencés dans des Lab-tek 4 puits à raison de 200000 cellules/ml (500 μl /puits) puis différenciés en myotubes selon le protocole décrit précédemment (*voir paragraphe 1 : culture cellulaire*). Suite aux différents traitements, le milieu de culture est éliminé.

A) Marquage des cellules

Les cellules sont rincées deux fois par du PBS à 4°C puis fixées au méthanol pendant 6 minutes sous agitation lente. Une fois la solution de fixation éliminée, les cellules sont rincées trois fois par du PBS avant d'être colorées aux réactifs May-Grünwald et Giemsa (Sigma). Les myoblastes et myotubes sont visualisés avec le microscope DMi8 (Leica) et les images sont réalisées avec le logiciel LAS-X. La

différenciation est déterminée en utilisant l'index de fusion qui est calculé par le nombre de noyaux dans les myotubes (> 2 noyaux) sur le nombre total de noyaux.

B) Marquage des filaments intermédiaires de desmine

Les cellules sont rincées à deux reprises par du PBS à 37°C puis fixées par une solution de méthanol/acétone (50/50, v/v) glaciale pendant 20 minutes à température ambiante. Après élimination de la solution de fixation, les cellules sont rincées avec le PBS puis à deux reprises par la solution de lavage (0,02% de BSA dans le PBS) ; elles sont ensuite incubées en présence de la solution de blocage (0,5% de BSA dans le PBS) pendant 1 heure, à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec la solution de blocage contenant l'anticorps primaire anti-desmine (ab15200, Abcam), dilué au 500^e. Les cellules sont ensuite rincées à trois reprises par la solution de lavage, puis incubées pendant 2 heures, à température ambiante et à l'obscurité à l'aide de la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire anti-lapin dilué au 200^e couplé à un Alexa Fluor 488 (Life Technologies). Les cellules sont ensuite rincées à trois reprises par la solution de lavage.

A la suite de ce marquage, les cellules sont rincées par le PBS, puis incubées pendant 5 minutes, à température ambiante et à l'obscurité à l'aide d'une solution de PBS contenant du DAPI à raison de 1 µl/ml. Après trois lavages des cellules par le PBS, le montage lame-lamelle est réalisé à l'aide de la solution de montage ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen).

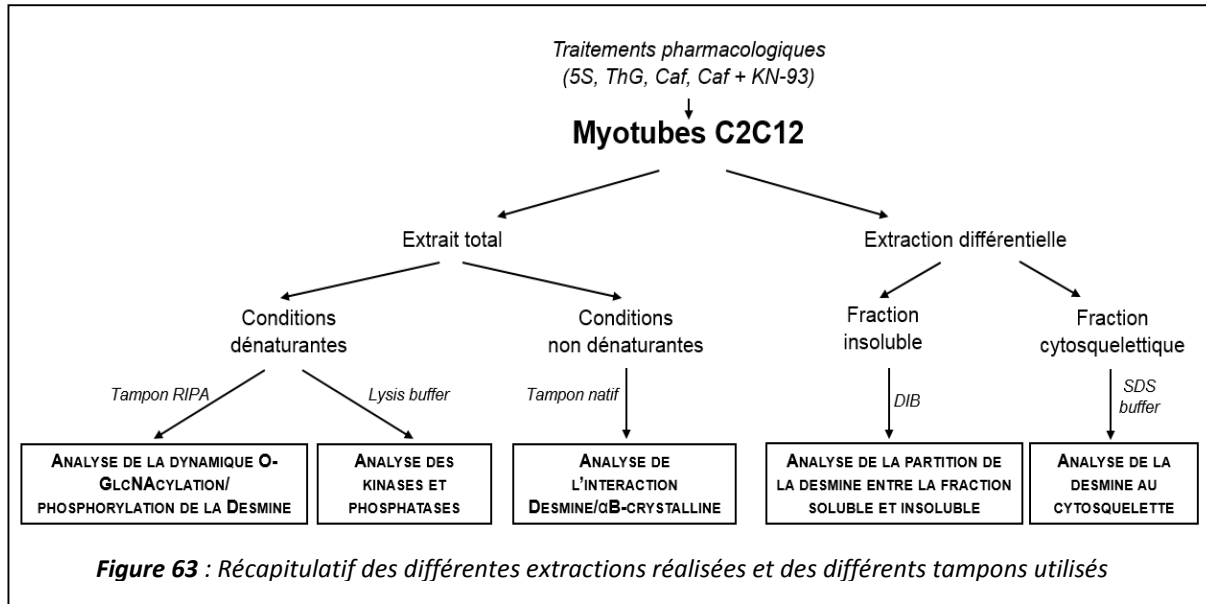
L'organisation des filaments intermédiaires de desmine est visualisée par microscopie confocale (LSM 780, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). L'excitation des fluorophores est réalisée simultanément par une diode de longueur d'onde 405 nm pour le DAPI ou par un laser de longueur d'onde 488 nm pour l'Alexa Fluor 488. Les images sont acquises selon un objectif Apochromat 40x/ 1,3 immergé sous huile, et le logiciel Zen (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Pour chaque condition, plusieurs images de myoblastes et de myotubes sont réalisées à l'aide du logiciel ImageJ. Le protocole d'acquisition des images a été réalisé en collaboration avec Elodie Richard (Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire, plateforme GIS-IBISA BICel, Université de Lille).

IV) Préparation des échantillons

A) Extraction et fractionnement des protéines

Le milieu de culture est éliminé et les cellules rincées deux fois par du PBS à 4°C. Les protéines sont extraites par grattage et lyse des cellules en présence de 150 µL/boîte de tampon d'extraction selon les protocoles décrits ci-dessous. Ces différents tampons contiennent des anti-protéases (Complete

EDTA Free (Roche Diagnostics)), des anti-phosphatases (Phos-Stop (Roche Diagnostics)) et 50 μ M de O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyrano-silidene) amino-N-phényl-carbamate (PUGNAc)(Sigma), un inhibiteur de l'OGA.



a) Extrait total et natif

Un tampon RIPA (10 mM Tris/HCl à pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 1% Triton X-100 ; 0,5% sodium déoxycholate ; 0,1% SDS) et natif (20 mM Bis-Tris à pH 7 ; 500 mM acide 6-amino-n-caproïque ; 20 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 10% glycérol) (Lambert *et al.* 2016) sont utilisés afin d'obtenir l'extrait total et natif, respectivement (figure 63).

b) Fractions soluble et cytosquelettique

Les cellules sont lysées par le tampon CLB (Cell Lysis Buffer : 50 mM PIPES à pH 7,4 ; 50 mM NaCl, 5% glycérol ; 0,1% Triton X-100 ; 0,1% Tween-20) après incubation pendant 1 minute 30 sur glace ; cet extrait correspond à la fraction soluble. Les cellules sont ensuite rincées par 300 μ l de Tris/HCl buffer (50 mM Tris/HCl à pH 7,5), puis par 100 μ l de Nucléase buffer (NB) (50 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 10 mM MgCl₂ ; 2 mM CaCl₂) additionnés de 10 U/ml de benzonase nucléase pendant 10 minutes. La fraction est récupérée puis ajoutée à celle du CLB. Les protéines cytosquelettiques fixées sur la boîte sont rincées par le tampon Tris/HCl, puis resolubilisées par ajout de 30 μ l de tampon Tris/HCl supplémentés de SDS 1% ou par 30 μ l de tampon RIPA (Grose *et al.* 2015) (figure 63).

c) Fractions soluble et insoluble

Lorsque les cellules sont lysées par le tampon DSB (Detergent Soluble Buffer : 50 mM Tris/HCl à pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 1mM EDTA ; 1% Triton X-100) après incubation pendant 30 minutes sur glace, l'extrait protéique est centrifugé à 34000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré, tandis que le culot est resuspendu par ajout de 100 µl de Detergent insoluble buffer (DIB) (50 mM Tris/HCl à pH 6,8 ; 2% SDS ; 100 mM DTT ; 10% glycérol) (**figure 63**) ou resuspendu par 100 µl de tampon Laemmli (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, 5% β-mercaptoéthanol, 0,02% bleu de bromophénol) (*Choi et al. 2014*).

B) Déphosphorylation des échantillons

Vingt microgrammes de protéines sont incubés dans un tampon de déphosphorylation (50 mM Tris/HCl, pH 7,6 ; 100 mM NaCl ; 1 mM DTT ; 10 mM MgCl₂) sans anti-phosphatase (Phos-stop (Roche Diagnostics)) mais additionnés de 10-20 U de phosphatase alcaline (Sigma P6774) pendant 8 heures à 37°C. Ensuite, les protéines sont dénaturées dans du tampon Laemmli (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 ; 10% glycérol ; 2% SDS ; 5% β-mercaptoéthanol ; 0,02% bleu de bromophénol).

C) Dé-O-GlcNAcylation des échantillons

Vingt microgrammes de protéines sont incubés en présence d'anti-protéases, de tampon de déglycosylation G2 (New England Biolabs B17205) et d'enzyme β-hexosaminidase (New England Biolabs P07721) pendant 8 heures à 37°C. Ensuite, les protéines sont dénaturées dans du tampon Laemmli.

D) Dosage de la concentration en protéines

La concentration en protéines des extraits en tampons RIPA, natif, DSB et CLB est estimée grâce au dosage de Bradford, tandis que la concentration en protéines des extraits en tampons DIB et SDS est estimée par un dosage de Lowry.

V) Techniques d'enrichissement des protéines

A) Immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées

Avant l'immunoprécipitation, un « pré-clearing » est effectué par l'incubation de 30 µl de billes magnétiques couplées aux protéines G (Millipore) en présence de 100 µg d'extrait protéique total (extrait dans le tampon RIPA) dilués dans un volume total de 250 µl de tampon RIPA ; l'incubation est effectuée pendant une heure à 4°C sous agitation lente. L'échantillon non retenu est ensuite récupéré et incubé en présence de l'anticorps primaire RL-2 (ThermoFisher) dilué au 1/250^e toute la nuit à 4°C sous agitation lente. Suite à cela, l'échantillon est incubé en présence de 50 µl de billes magnétiques pendant 2 heures à 4°C. Les billes sont ensuite lavées séquentiellement par du tampon RIPA, du tampon RIPA/NaCl (90% RIPA ; 10% NaCl 0,5M), du tampon RIPA/TNE (50/50, v/v) et du tampon TNE (10 mM Tris/HCl à pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA). Pour finir, elles sont resuspendues dans 25 µl Laemmli et chauffées pendant 8 minutes à 95°C. La fraction soluble correspondant aux protéines immunoprécipitées est analysée par Western-Blot.

B) Co-immunoprécipitation des protéines

Avant la co-immunoprécipitation, un « pré-clearing » des billes magnétiques couplées aux protéines G (Millipore) est réalisé par du tampon natif. Pour cela, 100 µg d'extrait protéique dilués dans un volume total de 250 µl de tampon natif sont incubés en présence de 30 µl de billes magnétiques pendant une heure à 4°C sous agitation lente. L'échantillon non retenu est ensuite récupéré et incubé en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la desmine (Abcam), dilué au 1/250^e toute la nuit à 4°C sous agitation lente. Suite à cela, l'échantillon est de nouveau incubé par 50 µl de billes magnétiques pendant 2 heures à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 5 fois par le tampon natif puis resuspendues dans 25 µl de Laemmli et chauffées pendant 8 minutes à 95°C. La fraction correspondant aux protéines d'intérêt co-immunoprécipitées avec leurs partenaires protéiques est analysée par Western-Blot.

VI) Techniques électrophorétiques

A) SDS-PAGE

Les protéines dénaturées dans le tampon Laemmli sont séparées par SDS-PAGE, en particulier sur gels Stain-free (SF) acrylamide pré-coulés 7,5% ou AnykD (Mini-PROTEAN TGX, Biorad). Cette séparation électrophorétique est effectuée pendant 30 minutes à voltage constant de 300 volts dans

une cuve contenant du tampon de migration (190 mM Glycine ; 25 mM Tris base ; 0,1% SDS). A la fin de la migration, les protéines du gel sont visualisées après activation par UV à l'aide de l'imageur ChemiDoc MP (Imaging System, Biorad) et du logiciel ImageLab (Biorad), permettant de visualiser le protéome total d'un échantillon grâce à la technologie Stain-free. Cette technologie est basée sur l'incorporation d'un composé trihalo dans le gel, réagissant avec les protéines et se fixant de manière covalente aux résidus de tryptophane, rendant ces protéines détectables. Ici, les gels sont exposés aux UV pendant 2,5 minutes ou pendant 5 minutes après enrichissement protéique.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm avec le système de transfert Trans-blot Turbo (Biorad). Ce transfert semi-sec a lieu dans une cassette à 1,3 A et 25 V par mini-gel pendant 10 minutes. Suite à cette étape, la détection des protéines du gel sur la membrane est effectuée à l'aide de l'imageur ChemiDoc MP grâce à la technologie Stain-free afin de s'assurer du bon transfert des protéines.

B) Phos-tag PAGE

L'extrait protéique préalablement dénaturé par le tampon Laemmli est séparé sur gel Phos-tag PAGE de 1,5 mm d'épaisseur, composé :

- D'un gel de concentration (4% acrylamide/bisacrylamide [29:1] ; 125 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 0,01% SDS ; 0,06% APS ; 0,034% TEMED)
- D'un gel de séparation (7,5% ou 12% acrylamide/bisacrylamide [29:1] ; 375 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 0,01% SDS ; 10 mM MnCl₂ ; 20 µM Phos-Tag™ acrylamide [AAL-107, NARD Institute] ; 0,5% APS ; 0,1% TEMED)

La séparation électrophorétique est effectuée dans une cuve contenant le tampon de migration précédemment décrit à ampérage constant de 25 mA par gel pendant environ 110 minutes. Après la migration, les gels Phos-tag sont incubés pendant 7 minutes à deux reprises dans le tampon de transfert (20% Ethanol ; 20% Transfert buffer 5X [Trans-Blot Turbo, BioRad]) auquel on ajoute 1 mM d'EDTA, puis à deux reprises dans ce même tampon sans EDTA. Puis, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF de porosité 0,2 µm avec le même système décrit précédemment (*voir paragraphe SDS-PAGE*). La qualité du transfert est contrôlée en réalisant une image grâce à l'imageur ChemiDoc MP suite à l'incubation des membranes dans le rouge Ponceau.

C) WGA-PAGE

L'extrait protéique préalablement dénaturé par le tampon Laemmli est séparé par un gel WGA de 1 mm d'épaisseur composé de trois gels différents (*Kubota, Fujioka, et Takekawa 2017*) :

- Un gel de concentration (5% acrylamide/bisacrylamide [37,5:1] ; 125 mM Tris/HCl, pH 6.8 ; 0,1% SDS ; 0,06% APS 10% ; 0,034% TEMED)
- Un gel WGA (7,5% ou 12,5% acrylamide/bisacrylamide [37,5:1] ; 375 mM Tris/HCl, pH 8.8 ; 0,1% SDS ; 0,5% APS 10% ; 0,1% TEMED ; 4% WGA 10 mg/ml [BioWorld Tritium Vulgaris (Wheat) lectin] diluée dans un tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7.5) mesurant 0,9 cm de haut
- Un gel de séparation (7,5% ou 12,5% acrylamide/bisacrylamide [37,5:1] ; 373 mM Tris/HCl, pH 8.8 ; 0,1% SDS ; 0,5% APS 10% ; 0,1% TEMED) mesurant 3,75 cm de haut

La migration électrophorétique est réalisée dans le tampon de migration décrit précédemment à ampérage constant de 25 mA par gel. Ensuite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm avec le même système décrit précédemment (*voir paragraphe SDS-PAGE*). La qualité du transfert est contrôlée en réalisant une image grâce à l'imageur ChemiDoc MP suite à l'incubation des membranes dans le rouge Ponceau.

VII) Analyse protéique par western-blot

A) Saturation / incubation anticorps primaires

La saturation de la membrane s'effectue dans une solution contenant 5% de lait écrémé ou de BSA dans du TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween : 15 mM Tris/HCl, pH 7,6 ; 140 mM NaCl ; 0,05% Tween-20) pendant une heure à température ambiante et sous agitation constante. Suite à cela, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C sous agitation à l'aide de la solution de saturation contenant les anticorps primaires (**tableau 2**). Puis, trois rinçages de 10 minutes chacun sont réalisés dans du TBS-T.

B) Incubation anticorps secondaires / Révélation

La membrane est incubée pendant une heure à température ambiante sous agitation constante à l'aide de la solution de saturation contenant les anticorps secondaires (Anti-lapin et/ou anti-souris, HRP-linked IgG, Cell Signaling #7074 ou #7076 respectivement). Cinq rinçages consécutifs de 10 minutes chacun sont réalisés dans du TBS-T. Ensuite, le réactif ECL Clarity (Biorad) est déposé de manière homogène avant de révéler la membrane grâce à l'imageur ChemiDoc MP. Les images sont acquises et analysées à l'aide du logiciel ImageLab® (Biorad).

Espèce	Cible	Poids moléculaire	Solution blocage	Dilution anticorps I ^{aire}	Dilution anticorps II ^{aire}	Référence
Souris	RL-2	/	BSA 5%	2500 ^e	20000 ^e	MAI-072
Lapin	OGT	110 kDa	Lait 5%	2000 ^e	10000 ^e	ab50273
Souris	OGA	147 kDa	Lait 5%	2000 ^e	10000 ^e	ab68522
Souris	Desmine	53 kDa	Lait 5%	50000 ^e	20000 ^e	ab6322
Lapin	CamKII	56 kDa	BSA 5%	1000 ^e	10000 ^e	#4436
Lapin	P-CamKII	56 kDa	BSA 5%	1000 ^e	10000 ^e	#12716
Lapin	PAK1	61-65 kDa	Lait 5%	1000 ^e	5000 ^e	#2602
Lapin	P-PAK1/2	61-65 kDa	Lait 5%	1000 ^e	5000 ^e	#2606
Souris	Ubiquitine	/	Lait 5%	5000 ^e	5000 ^e	#3936
Lapin	αB-cristalline	20 kDa	Lait 5%	2000 ^e	10000 ^e	ab13497
Lapin	Akt	60 kDa	Lait 5%	2000 ^e	10000 ^e	#92725
Souris	GAPDH	37 kDa	Lait 5%	2000 ^e	10000 ^e	ab9485

Tableau 2 : Caractéristiques et dilutions des anticorps utilisées pour le western-blot

VIII) Analyse de l'activité des kinases et des phosphatases

A) Dosage de l'activité de PKA et PKC

L'activité de PKA et PKC est mesurée en utilisant un kit de dosage spécifique (Abcam 139435 et 139437 respectivement) selon le protocole du fabricant. Brièvement, les cellules sont lysées grâce à un tampon de lyse (20 mM MOPS ; 5 mM EGTA ; 1% NP40 ; 1 mM DTT) (**figure 63**) et après une centrifugation à 34000 g pendant 10 minutes à 4°C, la quantité protéique du surnageant est déterminée par un dosage BCA. Ensuite, 1 µg d'extrait protéique est utilisé pour la détection d'un substrat phospho-peptide spécifique par la technique ELISA, qui est phosphorylé par PKA ou PKC active. Le niveau de phosphorylation de l'échantillon est mesuré par spectrophométrie à 450 nm.

B) Détection « en gel » de l'activité des phosphatases

L'activité des phosphatases est analysée par un dosage « en gel » grâce à un substrat fluorogène, le MUP (4-méthylumbelliféryl phosphate) qui est converti en produit fluorescent une fois hydrolysé par la(les) phosphatase(s). Après lyse des cellules par un tampon RIPA dépourvu de SDS et d'anti-phosphatases (Phos-Stop (Roche Diagnostics)), le contenu protéique est estimé par dosage Bradford.

Ensuite, 75 µg de protéines sont séparés par Native-PAGE en utilisant la même procédure que le SDS-PAGE sauf que le gel de séparation 10% et de concentration 4% acrylamide/bisacrylamide [37,5 :1], le tampon Laemmli et le tampon de migration ne contiennent pas de SDS. La séparation électrophorétique est réalisée à ampérage constant (20 mA/gel) et à 4°C pour prévenir la perte d'activité des phosphatases pour environ 110 minutes. Directement après la séparation, le gel natif est incubé dans la solution de réaction (50 mM Tris/HCl, pH 8 ; 0,1 mM EGTA ; 0,01% Tween 20 ; 20 mM β-mercaptoéthanol ; 20 mM MnCl₂ ; 0,5 mM MUP à 10 mM dans le DMSO) pendant 15 minutes à 37°C avec agitation manuelle chaque minute. Les bandes fluorescentes correspondant à l'activité des phosphatases sont détectées après exposition aux UV (365 nm) par le ChemiDoc MP (Biorad).

IX) Identification des protéines des fractions insoluble et cytosquelettique

A) Précipitation des échantillons

Deux cents microgrammes de chaque échantillon subissent une précipitation au chloroforme/méthanol. Brièvement, 3 volumes de méthanol, 0,75 volume de chloroforme et 2 volumes d'eau spéciale spectrométrie de masse sont ajoutés à l'échantillon avant d'effectuer une centrifugation pendant 2 minutes à 15000 g. La phase aqueuse supérieure est éliminée et 2,25 volumes de méthanol sont ajoutés avant de réaliser la même centrifugation que décrite précédemment. Le surnageant est éliminé tandis que le culot est mis à sécher sous hotte pendant environ 2 heures.

B) Réduction, alkylation et digestion des protéines

Le culot est resuspendu par du tampon de digestion (0,1M NH₄HCO₃) additionné de tampon de réduction (10 mM DTT (dithiothreitol) pendant 5 minutes à 80°C. Lorsque les échantillons ont refroidi, ils sont incubés en présence de tampon d'alkylation (50 mM IAA (iodoacétamide)) pendant 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, après l'ajout de 0,1 µg de trypsine pendant 3 heures à 37°C, on ajoute de nouveau 0,1 µg de trypsine pendant la nuit à 37°C.

C) Analyse par spectrométrie de masse de type nano-LC-MS (nano liquid chromatography – mass spectrometry)

Lorsque les peptides ont été digérés, ils sont séparés sur un système U3000 nano-LC (Dionex-LC Packings, Sunnyvale, CA, USA). Après une étape standard de pré-concentration (C18 cartridge, 300 µm, 1 mm), les peptides sont séparés sur une colonne de chromatographie en phase inverse sur phase C18

(Acclaim PepMap100, 75 μm i.d. x 15 cm, 3 μm , 100 \AA) avec un gradient d'ACN (0% d'ACN pendant 3 minutes ; 0 à 15% d'ACN pendant 7 minutes ; 15% à 65% d'ACN pendant 42 minutes ; 65% à 90% d'ACN pendant 5 minutes, et 90% d'ACN pendant 6 minutes). Le débit est établi à 300 nl/min et un total de 110 fractions sont automatiquement collectées (une toutes les 30 secondes) puis déposées sur une cible AnchorChip™ 600 MALDI grâce au collecteur de fractions Proteiner™ (Brukers Daltonics). La matrice CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) est ajoutée à chaque dépôt ; 2 μl de matrice, à une concentration de 0,3 mg/ml dans l'acétone : éthanol : 0.1% TFA (3 : 6 : 1 v/v/v) sont ainsi déposés durant le processus de collecte des fractions.

X) Analyse statistique

L'étude densitométrique des signaux résultant des Western-Blot est effectuée par le logiciel ImageLab® ; les quantifications sont normalisées au profil protéique obtenu par la détection Stain free ou à l'aide d'un standard interne. Les groupes sont comparés entre eux à l'aide d'un test Kruskal-Wallis (GraphPad Prism®) et les échantillons sont distribués sur différents gels effectués en parallèle. Les expériences sont réalisées sur cinq boîtes par cultures et sur trois cultures indépendantes ($n = 15$; $N = 3$). Les résultats sont présentés sous forme de tableaux ou d'histogrammes avec la moyenne \pm l'écart-type standard à la moyenne (SEM) et les valeurs aberrantes sont supprimées si elles existent. Les niveaux de significativité sont indiqués par * si $p < 0,05$, ** si $p < 0,01$, *** si $p < 0,001$.

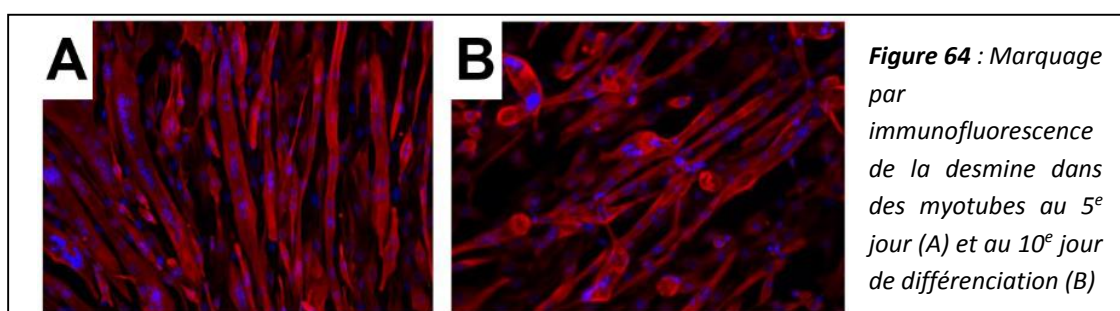
RESULTATS

Avant-propos

Lors des réflexions faites pour réaliser cette étude, le choix du modèle a été discuté. Bien qu'un modèle animal reste toujours plus proche de ce qui pourrait être obtenu chez l'Homme, le choix s'est porté sur un modèle cellulaire pour la simplicité de mise en œuvre. En effet, il s'avère être beaucoup plus simple de faire varier le taux d'O-GlcNAcylation à l'aide de molécules pharmacologiques dans les cellules que chez les animaux. De plus, la culture cellulaire permet d'obtenir des échantillons rapidement, en grand nombre et présentant une grande reproductibilité. Enfin, puisqu'aucune donnée bibliographique existe concernant l'impact de la O-GlcNAcylation sur la desmine dans le muscle squelettique, le modèle cellulaire est le plus adapté pour cribler toutes les répercussions de la MPT sur notre protéine d'intérêt.

Le modèle cellulaire choisi pour mes travaux de thèse correspond aux myoblastes murins de lignée C2C12 (*Blau, Chiu, et Webster 1983*). Cette lignée a été choisie pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, elle est utilisée en routine au laboratoire depuis de nombreuses années et ces myoblastes sont capables de proliférer et fusionner afin de former des myotubes matures. De plus, des études en lien avec mes travaux de thèse ont été réalisées sur ce même modèle (*Lambert et al. 2016; Charrier et al. 2016*). Enfin, ces cellules ont la capacité de répondre rapidement aux stimulus physico-chimique conduisant à des changements métabolique, morphologiques et fonctionnels de celles-ci (*Burattini et al. 2004*).

Notre but étant de moduler le taux global d'O-GlcNAcylation sur des cellules se rapprochant le plus de l'aspect physiologique, nous avons ensuite dû choisir le jour au cours duquel les traitements pharmacologiques seraient appliqués. Dans la bibliographie et d'après des données préliminaires du laboratoire, ce stade est défini au 5^e jour de différenciation. En effet, une analyse cinétique de l'expression des protéines structurales avait été réalisée montrant un pic du niveau protéique au 5^e jours. De plus, des marquages de la desmine ont révélé que celle-ci était localisée de manière homogène au sein de myotubes au 5^e jour de différenciation (**figure 64**) alors que son expression et sa localisation semblaient être altérées chez des myotubes au 10^e jour de différenciation (**figure 64**). Ces données sont également en lien avec le fait qu'à partir d'un certain stade de différenciation, les myotubes dégénèrent.



Un certain nombre de protocoles expérimentaux utilisés lors de ces travaux n'étaient pas en place au laboratoire. C'est pourquoi, certaines approches ont nécessité une optimisation importante de protocoles pré-existants ou récemment publiés. Ces différentes étapes de mises au point seront détaillées en amont des résultats correspondants.

I) Modulation du taux global d'O-GlcNAcylation

A) Approches méthodologiques pour moduler le taux de O-GlcNAcylation

Il existe de nombreuses stratégies afin de moduler le taux global d'O-GlcNAcylation dans les cellules. Pour rappel, le motif GlcNAc est ajouté sur les protéines par l'enzyme OGT dont l'unique substrat est l'UDP-GlcNAc, provenant de la voie de biosynthèse des hexosamines. Cette voie étant très sensible à la disponibilité du glucose intracellulaire, la première possibilité est d'exposer les cellules à des conditions hypo- ou hyperglycémiantes. Pour cela, il est possible de placer les cellules dans un milieu de culture à 1 g/L ou 4,5 g/L de glucose dans le but de faire varier le flux de la voie de biosynthèse des hexosamines (*Chun et al. 2015*). Outre le glucose, il existe un autre facteur limitant à cette voie métabolique ; il s'agit de l'enzyme GFAT, qui permet de transformer le fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate. Certaines molécules telles que l'azasérine ou le DON (*J. Liu, Marchase, et Chatham 2007; Kim et al. 2021*) ont été utilisées afin d'inhiber cette enzyme, réduisant la production d'UDP-GlcNAc et donc la O-GlcNAcylation. A l'inverse, le taux d'O-GlcNAcylation peut être augmenté en ajoutant de la glucosamine dans le milieu de culture ou bien en l'administrant chez l'animal (*Kwak et al. 2010*). Celle-ci va être convertie en glucosamine-6-phosphate et pourra intégrer la voie de biosynthèse des hexosamines afin de produire le produit final de la voie métabolique, qui servira de substrat à l'OGT. Contrairement au changement de taux de glucose dans le milieu, l'intérêt principal de l'ajout de glucosamine est qu'elle va augmenter de manière plus efficace le taux d'O-GlcNAcylation. En effet, puisque la glucosamine-6-phosphate arrive après la GFAT dans la voie, cette dernière ne pourra pas exercer son rôle de rétrocontrôle négatif pour freiner la production d'UDP-GlcNAc.

Enfin, au-delà de moduler la production d'UDP-GlcNAc, il est également possible de venir inhiber directement le couple d'enzyme qui régule le mécanisme d'O-GlcNAcylation (*Ma et Hart 2013*). La mise au point et le développement de ces molécules pharmacologiques spécifiques s'est fait d'années en années. Il existe aujourd'hui plusieurs inhibiteurs de l'OGT tels que l'UDP-5S-GlcNAc, l'alloxan, le ST045849, le BZX, l'Osmi-1 et de l'OGA comme le thiamet G, la PUGNAc, le NAG-thiazoline, le NButGT, le MK8719 ou encore les GlcNAcstatines (*Alteen, Tan, et Vocadlo 2021*). Cependant, certaines molécules et certains effets restent encore trop peu efficaces puisque la spécificité de certains composés n'est pas bien définie. En effet, certaines molécules présentent une spécificité relative pour leur substrat et vont avoir des effets non attendus sur d'autres molécules (effet « off-target ») (*Dehennaut et Lefebvre 2013*). C'est le cas de la PUGNAc qui, en plus de cibler l'OGA va également cibler les N-glycannes (*Mehdy et al. 2012*).

Pour pallier à l'utilisation de ces substances, des chercheurs sont directement intervenus sur le gène codant pour ces enzymes par adénovirus pour les surexprimer ou par siARN ou knock-out inducible pour réduire voire totalement abolir leur expression (*O'Donnell et al. 2004; Watson et al. 2014; Walter et al. 2020*) (**figure 65**). Il existe cependant un inconvénient majeur à ces méthodes qui touchent les enzymes régulatrices. En effet, puisque la O-GlcNAcylation est régulée par un unique couple enzymatique, le fait de modifier leur expression ou leur activité aura non seulement des répercussions sur le mécanisme cellulaire étudié mais également sur d'autres fonctions. De plus, il existe des phénomènes de rétrocontrôles qui vont venir moduler l'expression et/ou l'activité des enzymes dans un souci de stabilité de la O-GlcNAcylation au sein de l'organisme (*Decourcelle et al. 2020*). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de l'OGT conduisait à une augmentation de sa propre expression et à une diminution de l'expression de l'OGA, et inversement.

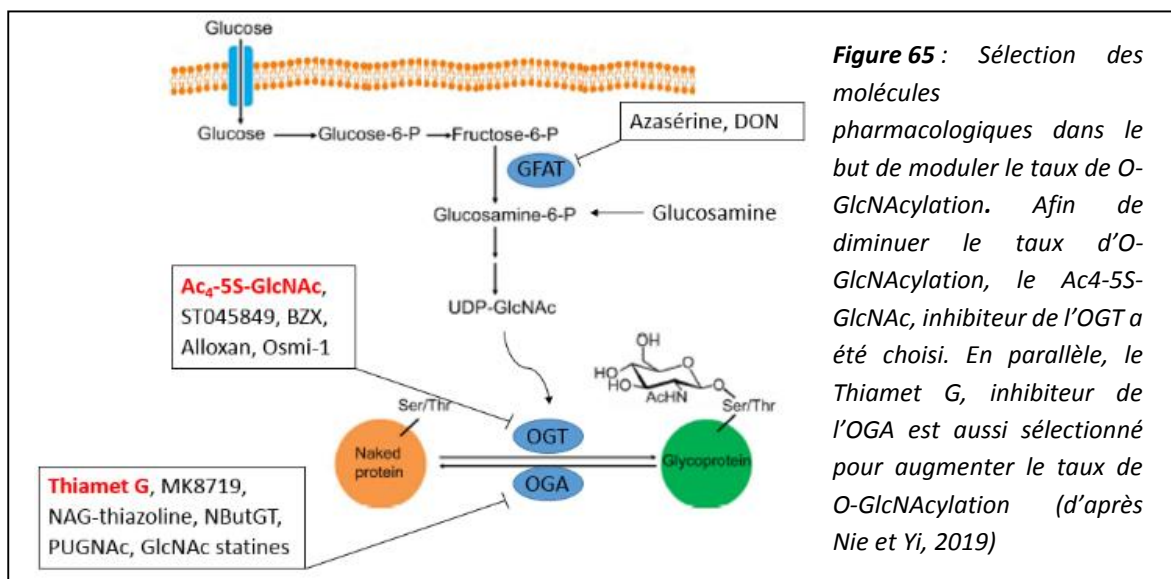


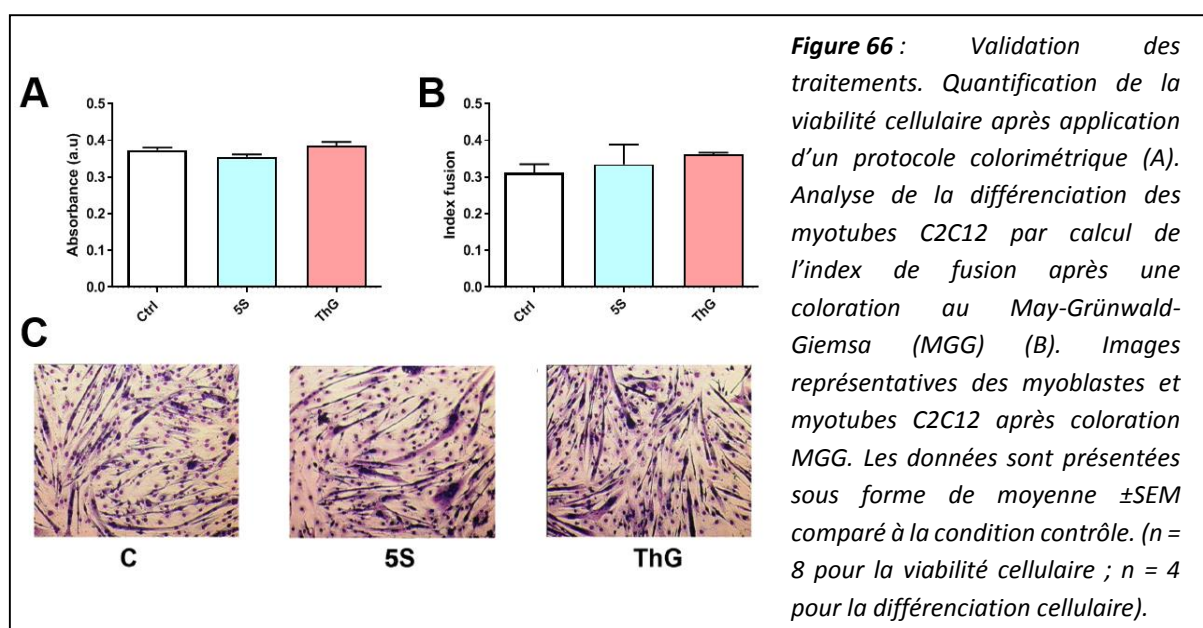
Figure 65 : Sélection des molécules pharmacologiques dans le but de moduler le taux de O-GlcNAcylation. Afin de diminuer le taux d'O-GlcNAcylation, le Ac₄-5S-GlcNAc, inhibiteur de l'OGT a été choisi. En parallèle, le Thiamet G, inhibiteur de l'OGA est aussi sélectionné pour augmenter le taux de O-GlcNAcylation (d'après Nie et Yi, 2019)

B) Modulation du taux global d'O-GlcNAcylation des cellules C2C12

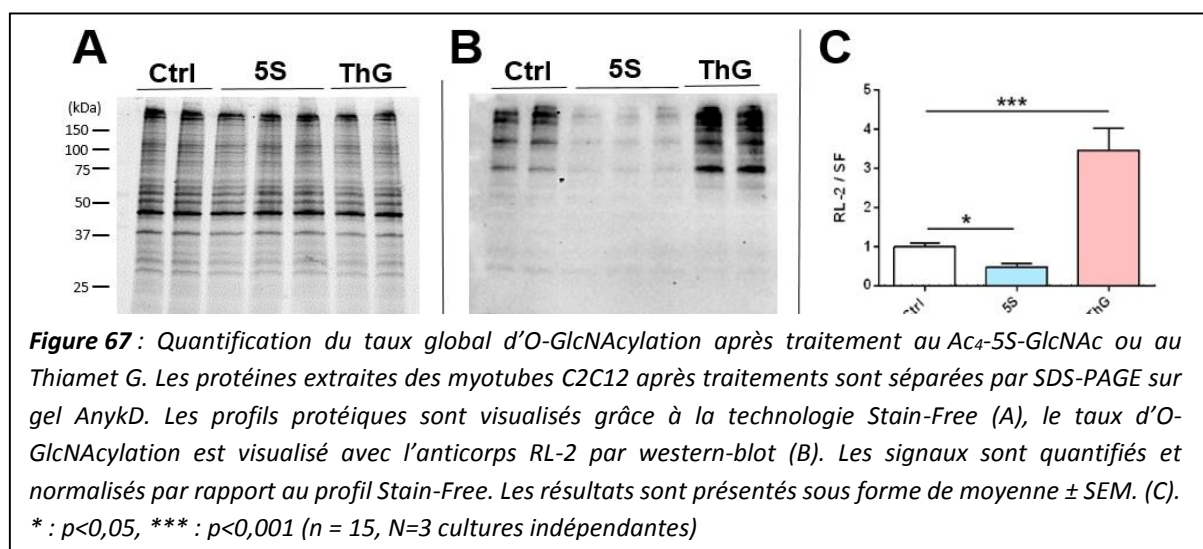
Pour cette étude, nous avons donc sélectionné des molécules pharmacologiques capables de modifier le taux global d'O-GlcNAcylation. Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser le Thiamet G qui est un inhibiteur de l'OGA (*Yuzwa et al. 2008*) puisque celui-ci avait déjà été utilisé au laboratoire lors d'une précédente étude et que son efficacité sur la O-GlcNAcylation avait été prouvée (*Lambert et al. 2016*). Afin d'inhiber l'OGT, notre choix s'est porté sur le Ac₄-5S-GlcNAc (5S) (*Gloster et al. 2011; Lazarus et al. 2013*).

Ces deux inhibiteurs sont appliqués sur les myotubes C2C12 matures au 5^e jour de différenciation. Alors que le traitement au Thiamet G avait déjà été optimisé au laboratoire, l'utilisation du Ac₄-5S-GlcNAc a dû être mise au point (concentration, durée) dans le cadre de mes travaux. De plus, leur efficacité a été déterminée par la quantification du taux d'O-GlcNAcylation dans les myotubes.

Ces inhibiteurs sont appliqués pendant la nuit à une concentration de 0,5 μM pour le Thiamet G et 5 μM pour le Ac₄-5S-GlcNAc. Les concentrations et la durée de traitement sélectionnées n'étaient pas cytotoxique puisqu'elles n'affectent pas la viabilité cellulaire (**figure 66A**), ni l'état de différenciation calculé grâce à l'index de fusion (**figure 66B-E**). Ces traitements n'induisent pas non plus de modifications du niveau protéique des enzymes responsables de la O-GlcNAcylation, l'OGT et l'OGA (données non présentées).



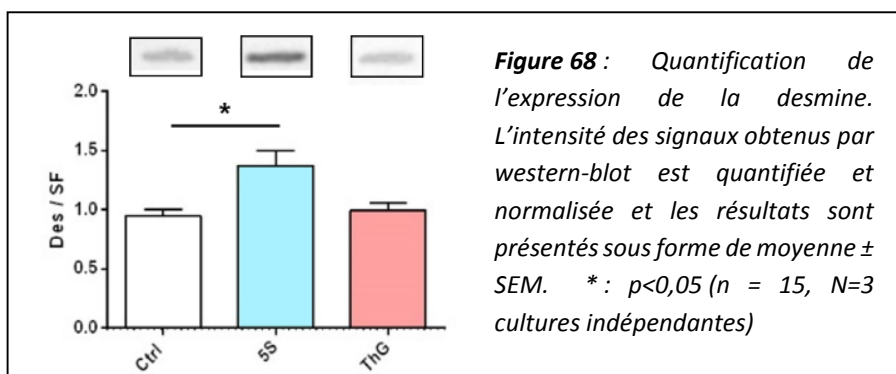
Comme le montre la **figure 67**, ces deux traitements n'entraînent pas de changement au niveau du profil protéique total obtenu par la technologie Stain-free après exposition aux UV (**figure 67A**). En revanche, ils sont efficaces sur la O-GlcNAcylation globale des cellules puisque le Ac₄-5S-GlcNAc conduit à une diminution significative du taux global d'O-GlcNAcylation des myotubes C2C12 de 52,7% ($0,54 \pm 0,11$, $p < 0,05$), alors que le Thiamet G induit une augmentation significative de 246,8% ($3,87 \pm 0,66$, $p < 0,01$) du taux d'O-GlcNAcylation (**figure 67C**) par rapport au contrôle ($1,00 \pm 0,26$)



II) Impact de changement d'O-GlcNAcylation sur la desmine

A) Expression de la desmine

Après avoir optimisé les traitements permettant de faire varier le taux global d'O-GlcNAcylation des cellules C2C12, nous avons analysé leur impact sur l'expression de notre protéine d'intérêt, la desmine en utilisant la technique du western-blot. La **figure 68** montre qu'un traitement au Ac₄-5S-GlcNAc entraîne une augmentation significative de l'expression de la desmine de 44% ($1,37 \pm 0,13$, $p < 0,05$) comparé au contrôle ($0,99 \pm 0,07$) alors que le Thiamet G n'a pas d'influence sur son expression.



B) Partition de la desmine

a) Choix et validation des protocoles de fractionnement

Pour aller plus loin dans cette réflexion et afin de voir si nos traitements avaient un effet sur la distribution de notre protéine d'intérêt au sein de la cellule, nous avons réalisé un fractionnement protéique. Pour cela, nous nous sommes inspirés de différents protocoles existants afin d'analyser les fractions protéiques soluble et insoluble, ainsi que la fraction du cytosquelette (**tableau 3**).

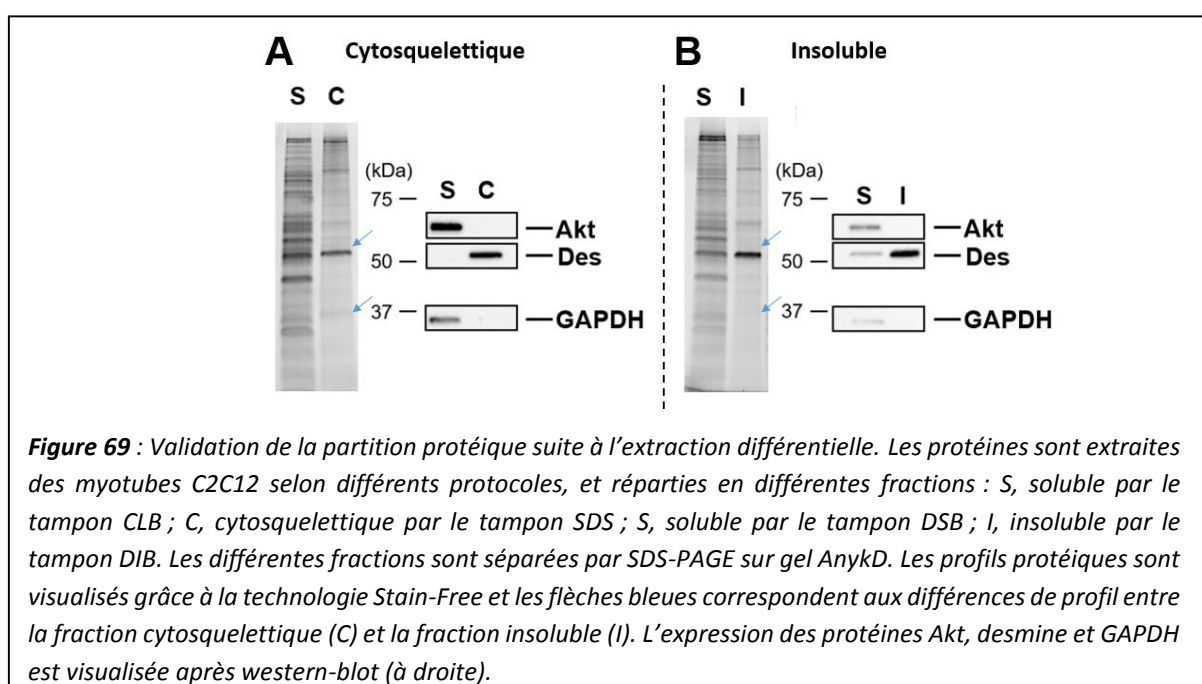
	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3
Tampon d'extraction	EB (extraction buffer)	TNE + 0,5% T-100	DSB (detergent soluble buffer)
Temps d'incubation	10 minutes sur glace	Directement	30 minutes sur glace
Homogénéisation	1h à 4°C		
Centrifugation (4°C)	18000 g, 10 minutes	14000 g, 20 minutes	34000 g, 10 minutes
	Surnageant = fraction soluble		
Solubilisation culot	Tampon Laemmli ou RIPA		
Référence	(Perng et al. 2004)	(Reddy et al. 2015)	(Grose et al. 2015)

Tableau 3 : Tableau comparatif des trois protocoles de fractionnement pour obtenir une fraction soluble (S) et insoluble (I).

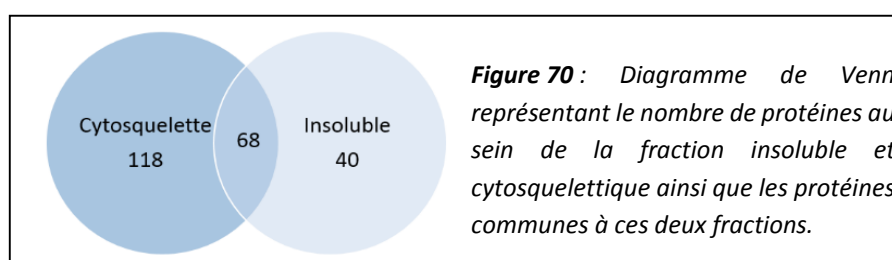
Notre choix s'est porté sur le protocole de Grose et son équipe, qui présentait la plus grande reproductibilité, pour obtenir les fractions soluble (S) et insoluble (I) (Grose et al. 2015) et sur le

protocole de Choi et collaborateurs afin d'isoler le cytosquelette (C) (Choi *et al.* 2014). Dans un premier temps, nous pouvons observer que les profils protéiques de ces fractions sont différents, en particulier les fractions solubles comparées aux fractions cytosquelettique et insoluble ; on observe également que malgré quelques signaux différents représentés par des flèches bleues sur la **figure 69**, les profils de la fraction cytosquelettique et de la fraction insoluble sont très similaires.

Afin de valider notre extraction différentielle, un western blot dirigé contre certaines protéines a été réalisé. Nous avons sélectionné les marqueurs Akt et GAPDH, protéines se retrouvant uniquement dans les fractions solubles (S) (**figures 69A et B**, bande gauche) mais également la desmine que l'on observe en majeure partie dans les fractions cytosquelettique (C) et insoluble (I) (**figures 69A et B**, bande droite).

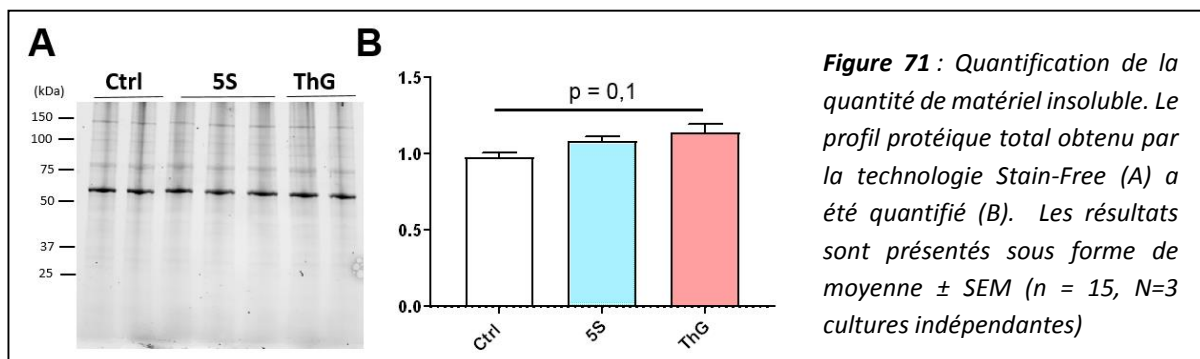


Nous avons complété notre analyse par l'identification par spectrométrie de masse des protéines présentes dans chacune de ces fractions (voir tableau en annexe). Comme le montre le diagramme de Venn présenté sur la **figure 70**, les fractions insoluble et cytosquelettique comptent 67 protéines identiques, 18 sont uniquement retrouvées dans la fraction insoluble tandis que 103 sont retrouvées dans la fraction cytosquelettique uniquement. Ces données sont cohérentes avec les observations que nous avons faites grâce aux profils protéiques de chaque fraction (**figure 70**).



b) Analyse de la fraction insoluble

A la suite de la validation de cette extraction différentielle, nous avons analysé la fraction insoluble dans sa globalité. Pour cela, l'ensemble du culot a été resuspendu dans du Laemmli, la totalité de l'échantillon a été séparé par SDS-PAGE et le profil protéique total de chaque échantillon obtenu par la technologie Stain-Free a été quantifié. La **figure 71** montre qu'un traitement au Ac₄-5S-GlcNAc ne modifie pas le contenu de la fraction insoluble, en revanche, le Thiamet G a tendance à augmenter la quantité de matériel insoluble ($1,14 \pm 0,05$, $p = 0,1$) par rapport au contrôle ($0,98 \pm 0,03$).

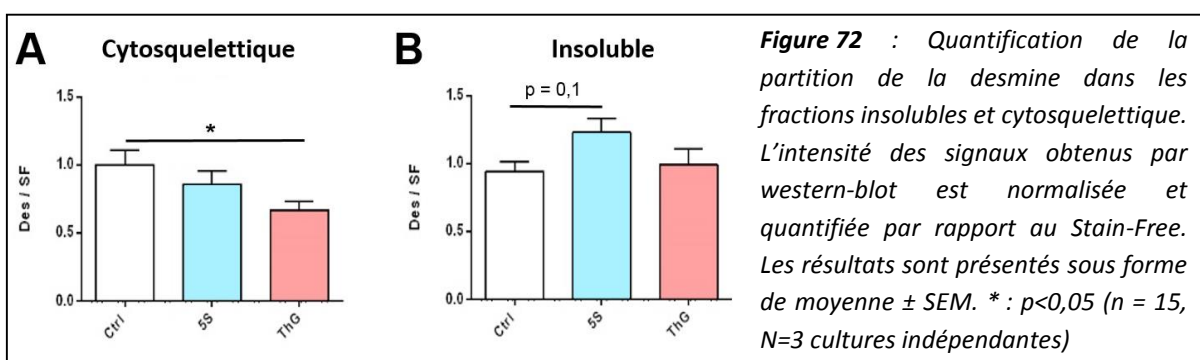


=

c) Analyse de la partition de la desmine

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la distribution cellulaire de la desmine, notre protéine d'intérêt, au sein de ces fractions grâce à la technique de western-blot. Les données de la **figure 72** montrent qu'un traitement au Thiamet G entraîne une diminution significative de 33% ($0,67 \pm 0,06$, $p < 0,05$) de la partition de la desmine dans la fraction cytosquelettique comparé au contrôle ($1,00 \pm 0,11$) (**figure 72A**). En revanche, ce traitement au Thiamet G n'a pas d'impact sur la partition de la desmine dans la fraction insoluble (**figure 72B**).

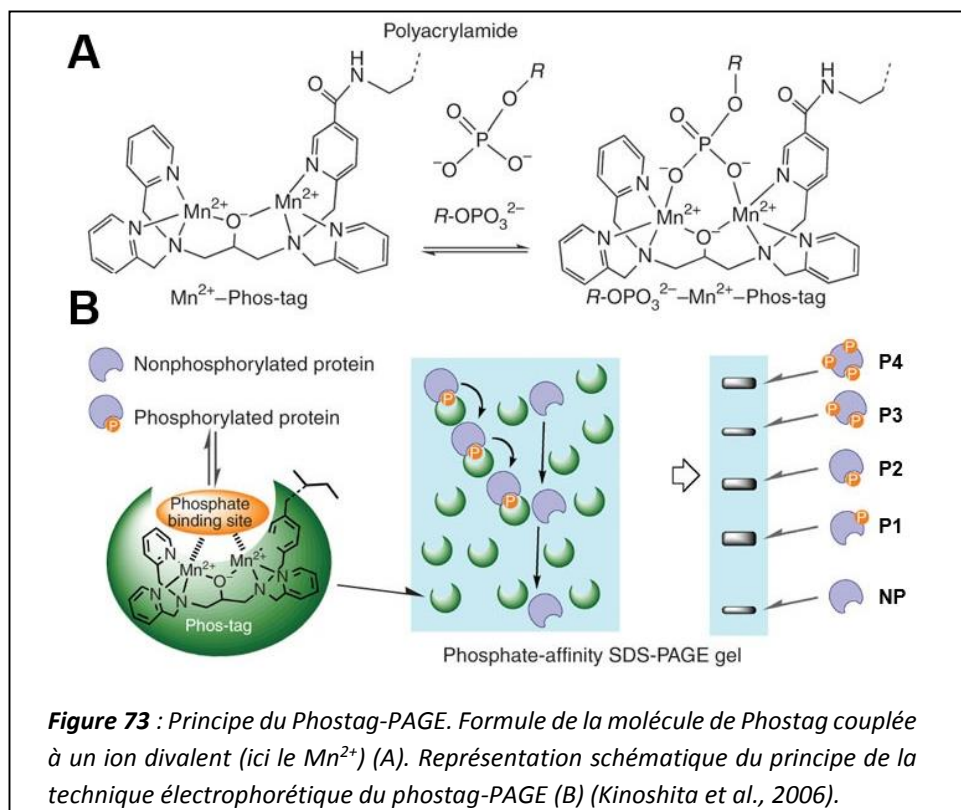
En revanche, le traitement au Ac₄-5S-GlcNAc entraîne une tendance à l'augmentation ($1,23 \pm 0,10$, $p=0,1$) de la distribution de la desmine dans le compartiment insoluble comparé au contrôle ($0,94 \pm 0,07$) mais il ne provoque pas de changement au niveau de sa localisation au niveau du cytosquelette (**figure 72A et B**).



C) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation globale sur la phosphorylation de la desmine

a) Choix de la technique d'étude de la phosphorylation : Phostag-PAGE

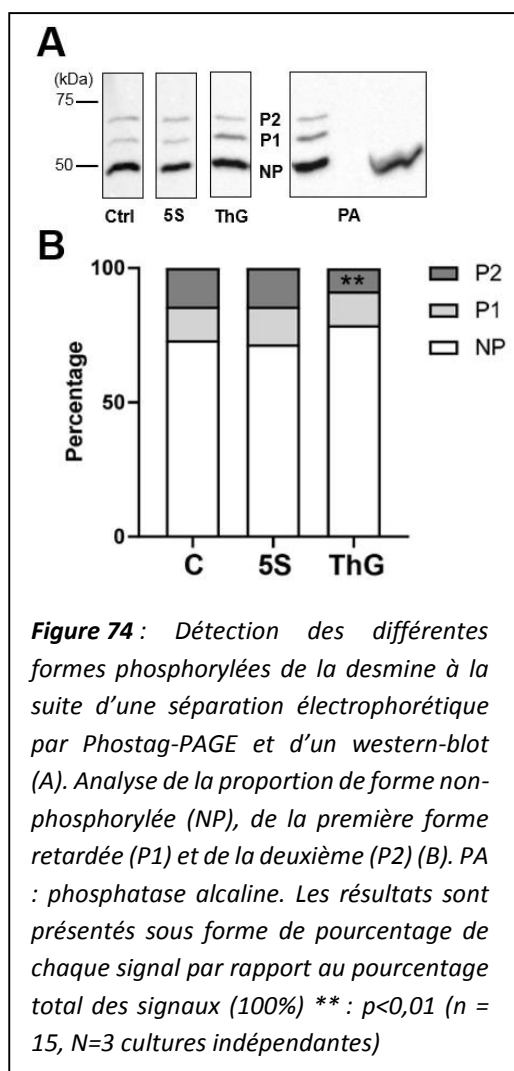
Pour étudier la phosphorylation, deuxième MPT très importante lors de cette étude, nous avons utilisé la technique de Phostag-PAGE qui présente trois avantages majeurs. Dans un premier temps, cette méthode permet d'analyser sans *a priori* les changements de phosphorylation. Deuxièmement, elle permet de s'affranchir de l'utilisation d'un anticorps phospho-spécifique pour analyser le site modifié. Pour rappel, la desmine présente un très grand nombre de sites modifiés par la phosphorylation et les anticorps ne sont pas tous disponibles. Enfin, elle permet d'éliminer les étapes intermédiaires qui existent lors d'une purification des protéines phosphorylées par chromatographie d'affinité, IMAC (immobilized metal affinity chromatography) ou par immunoprécipitation. A savoir que ces techniques requièrent l'utilisation d'anticorps dirigés contre les sérines et/ou thréonine et /ou tyrosine modifiées par la phosphorylation (P-Ser, P-Thr et P-Tyr). Le principe repose sur l'incorporation dans le gel de séparation du composé 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol qui, couplé à un cation métallique divalent, le plus souvent le manganèse (Mn^{2+}), va présenter une affinité pour le groupement phosphate chargé négativement (**figure 73A**). Ce composé, présentant un encombrement stérique important, entrainera une modification de migration des protéines sur lesquelles il est fixé puisqu'elles passeront difficilement le maillage formé par l'acrylamide dans le gel et seront donc retardées lors de la migration électrophorétique (**figure 73B**) (Kinoshita *et al.* 2006).



b) Analyse de la phosphorylation de la desmine

Cette technique de Phostag-PAGE permet donc de retarder les différentes formes phosphorylées d'une protéine et permet d'analyser plusieurs échantillons en simultané sur un même gel tout comme la technique de WGA-PAGE énoncé précédemment. Comme le montre la **figure 74A**, il existerait une forme non phosphorylée (NP) et deux formes retardées et donc phosphorylées, notées P1 et P2, pour la desmine, la forme P2 correspondant à la forme la plus retardée. Afin de valider ceci, nous avons déphosphorylé notre échantillon à l'aide de la phosphatase alcaline (PA), ce qui conduit à la disparition des deux formes retardées de la protéine tandis que seule la bande non retardée est observée après le traitement à la phosphatase alcaline (**figure 74A**, droite).

Alors qu'un traitement au Ac₄-5S-GlcNAc ne provoque pas de changement de phosphorylation de la desmine, le traitement au Thiamet G entraîne une diminution significative de l'intensité du signal de la deuxième forme phosphorylée (P2) (8,58% contre 14,36% pour le contrôle, $p < 0,01$) (**figure 74B**)



c) Identification des enzymes impliquées dans la phosphorylation de la desmine

Comme nous l'avons vu précédemment, un changement du taux global d'O-GlcNAcylation conduit à une modification du taux de phosphorylation de la desmine. Or, un changement de phosphorylation peut impliquer un changement de l'activité de kinase(s), et/ou un changement d'activité de phosphatase(s). Afin de mieux comprendre de la dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation, nous avons essayé de déterminer quelle(s) enzyme(s) est(sont) impliquée(s) dans les changements de phosphorylation de la desmine consécutivement aux variations globales d'O-GlcNAcylation.

➤ Analyse sans a priori des activités de phosphatases

- *Choix et validation de la technique d'analyse des phosphatases : MUP*

Afin d'analyser et d'identifier sans a priori la ou les phosphatase(s) pouvant présenter un changement d'activité après modification du taux global d'O-GlcNAcylation, nous utilisons un test d'activité de ces protéines en gel. Brièvement, l'activité des phosphatases est analysée par un dosage « en gel » grâce à un substrat fluorogène (MUP (4-méthylumbelliféryl phosphate) ou DiFMUP (6,8-difluoro-4-méthylumbelliféryl phosphate) qui est converti en produit fluorescent une fois hydrolysé par la(les) phosphatase(s). Les bandes fluorescentes correspondant à l'activité des phosphatases sont détectées après exposition aux UV (Kameshita et al. 2010) (figure 75).

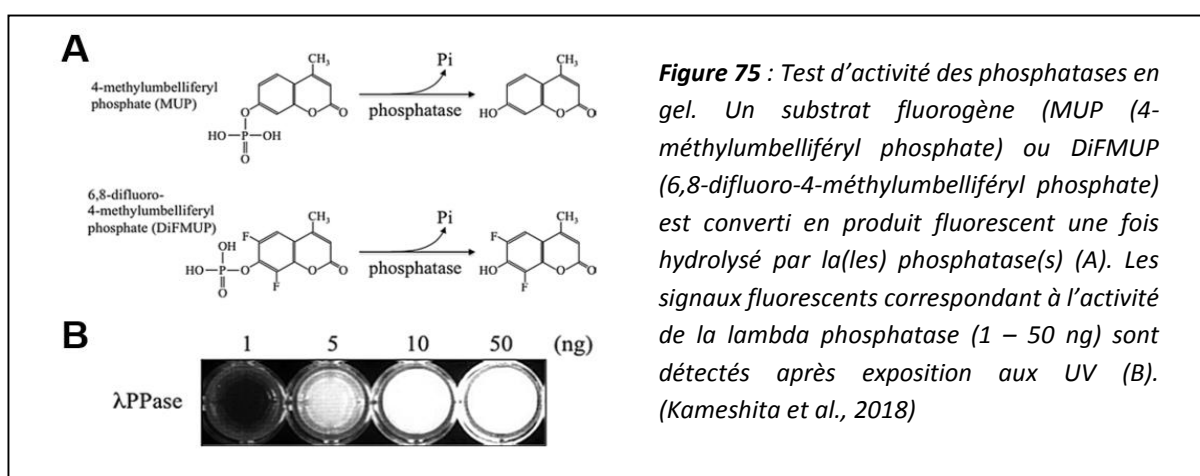


Figure 75 : Test d'activité des phosphatases en gel. Un substrat fluorogène (MUP (4-méthylumbelliféryl phosphate) ou DiFMUP (6,8-difluoro-4-méthylumbelliféryl phosphate) est converti en produit fluorescent une fois hydrolysé par la(les) phosphatase(s) (A). Les signaux fluorescents correspondant à l'activité de la lambda phosphatase (1 – 50 ng) sont détectés après exposition aux UV (B). (Kameshita et al., 2018)

Dans un premier temps, nous avons fait le choix d'utiliser le MUP plutôt que le diFMUP, puis nous avons validé la méthode avec l'utilisation de plusieurs phosphatases purifiées telles que la phosphatase intestinale du veau (CIP : calf intestine phosphatase (Biolabs, M0290S) ; CIP Q : calf intestine phosphatase quick (Biolabs, M0525S)) ou la lambda phosphatase (Biolabs, P0753S) à différentes quantités (1 ou 5 mU). Nous avons ainsi visualisé différents signaux, avec une corrélation entre l'intensité des signaux observés avec la quantité d'enzymes utilisées (figure 76). Nous avons ensuite optimisé ce protocole pour analyser les extraits protéiques des cellules C2C12 différenciées en myotubes.

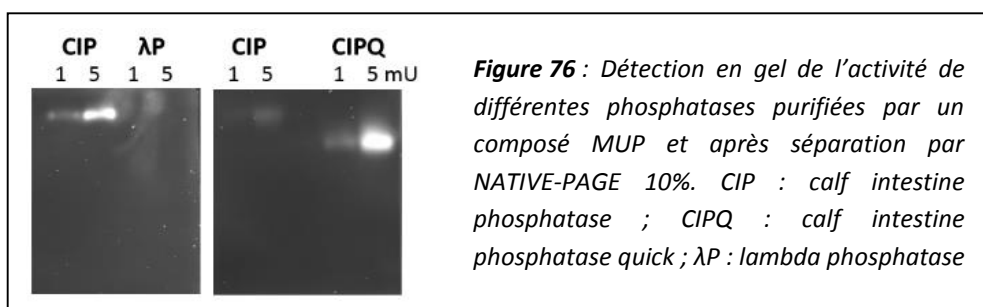
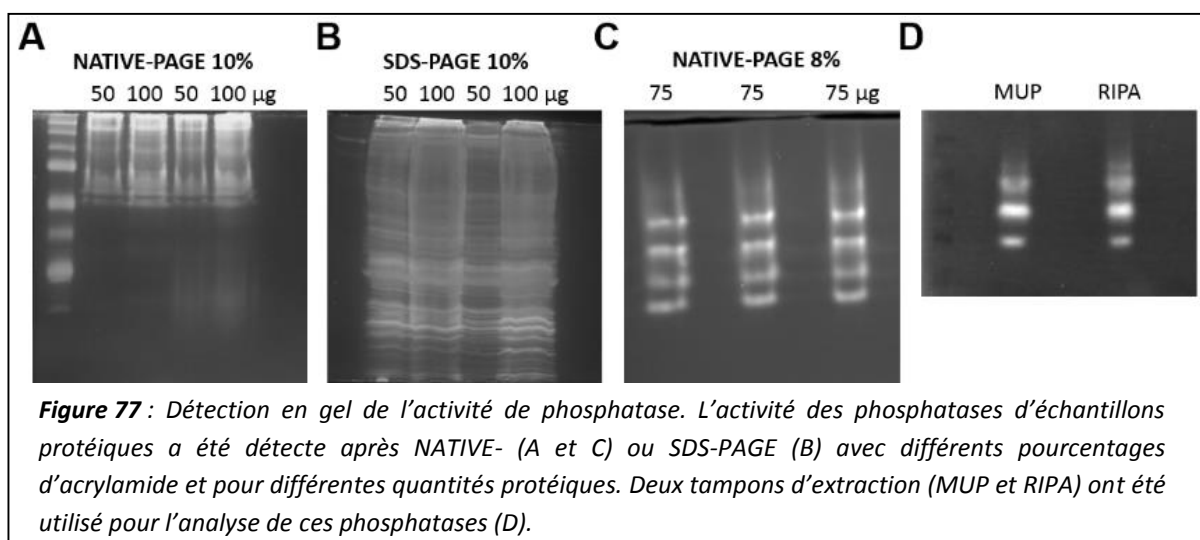


Figure 76 : Détection en gel de l'activité de différentes phosphatases purifiées par un composé MUP et après séparation par NATIVE-PAGE 10%. CIP : calf intestine phosphatase ; CIPQ : calf intestine phosphatase quick ; λP : lambda phosphatase

Dans un premier temps, nous avons déterminé quel était le gel le plus adapté à cette analyse. En effet, deux approches électrophorétiques peuvent être utilisées pour l'analyse des activités phosphatases : la NATIVE-PAGE, consistant en une migration électrophorétique sans agents réducteurs et sans agents dénaturants, et un SDS-PAGE classique nécessitant une étape de renaturation des enzymes. Pour cela, nous avons réalisé un SDS-PAGE classique et un NATIVE-PAGE avec chacun un gel à 10% d'acrylamide (**figure 77A-B**). Brièvement, pour le SDS-PAGE, après la migration, le gel passe dans différents bains successifs : pour éliminer le SDS, puis dans un premier bain dénaturant, un second et enfin dans un tampon renaturant. Avant l'exposition aux UV et la lecture du gel, ce dernier est plongé dans un tampon réactionnel contenant le substrat MUP.

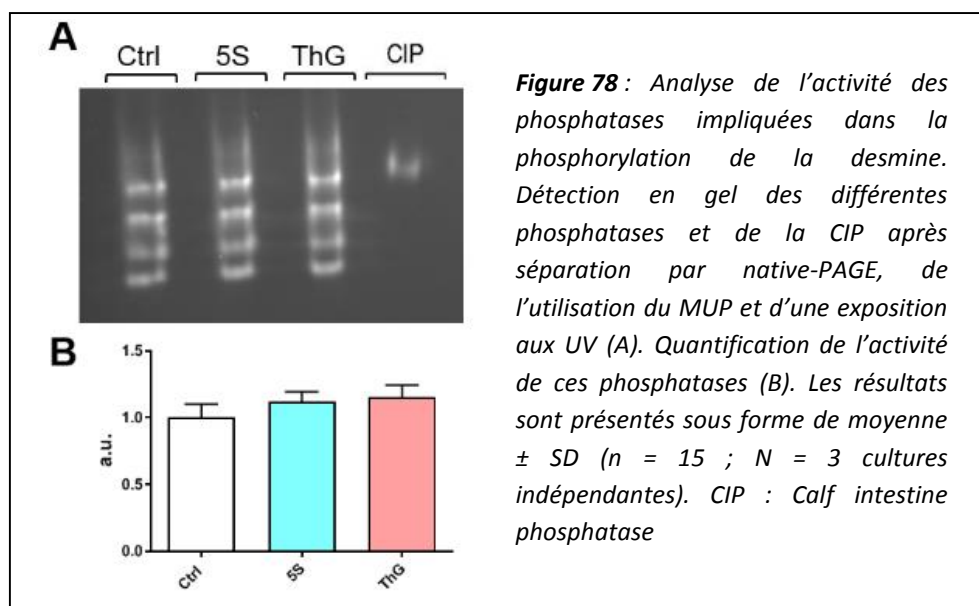
Nous avons également testé différentes quantités de protéines déposées (50 ou 100 µg). Enfin, nous avons choisi le tampon d'extraction des protéines le plus adapté et donnant les images les plus nettes entre le RIPA et un tampon MUP (5 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 0,5 mM EGTA ; 1 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoéthanol) (**figure 77D**).



La **figure 77** nous montre que dans le cas du SDS-PAGE 10% (**figure 77B**), les bandes correspondant aux phosphatases n'étaient que très peu séparées comparées au NATIVE-PAGE 10%, et étaient très peu résolues (**figure 77A**). Par ailleurs, nous avons également modifié le pourcentage de réticulation pour les gels natifs, en conditions non dénaturantes. Nous avons donc opté pour le NATIVE-PAGE avec un gel à 8% d'acrylamide (**figure 77C**) afin de mieux séparer les bandes que lorsque le gel comptait 10% d'acrylamide (**figure 77A**). De plus, puisqu'une quantité déposée de 50 µg semblait correcte et celle de 100 µg donnait des signaux un peu trop intenses avec une saturation des signaux, nous avons opté pour une quantité protéique déposée dans le gel de 75 µg (**figure 77A**). Enfin, puisque les deux tampons d'extraction semblaient donner sensiblement les mêmes signaux, nous avons privilégié le tampon RIPA dans un souci d'homogénéisation avec nos autres protocoles d'extraction (**figure 77D**).

- *Analyse des activités phosphatases*

Afin d'analyser l'activité des phosphatases, nous avons donc déposé 75 µg d'échantillon sur un gel natif contenant 8% d'acrylamide qui a ensuite été plongé dans un bain réactionnel contenant le composé MUP. Après l'exposition aux UV, la lecture du gel permet d'observer quatre bandes correspondant chacune à une activité phosphatase spécifique. La quantification de chacune de ces bandes (données non présentées) ou de la totalité des signaux de chaque échantillon ne nous permet pas d'observer de changement significatif de leur activité quel que soit le traitement appliqué (figure 77).



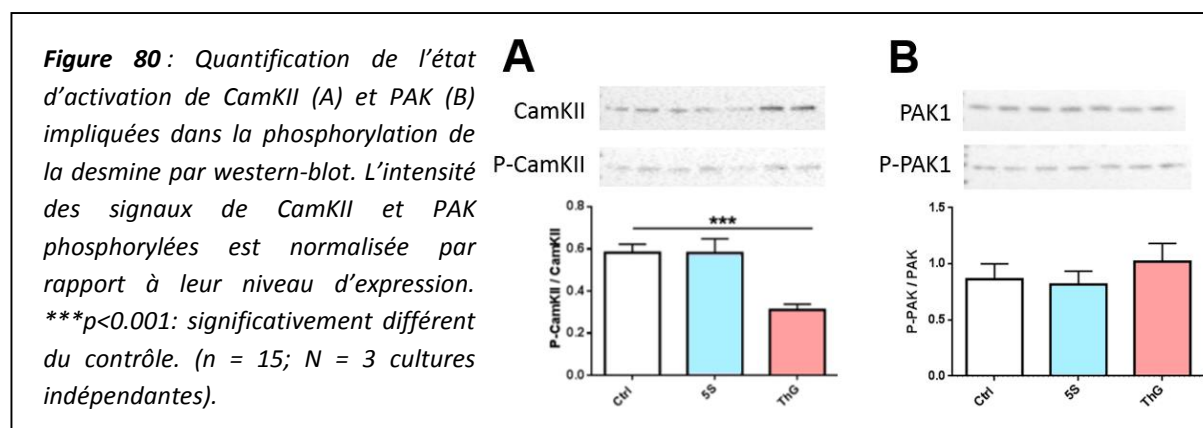
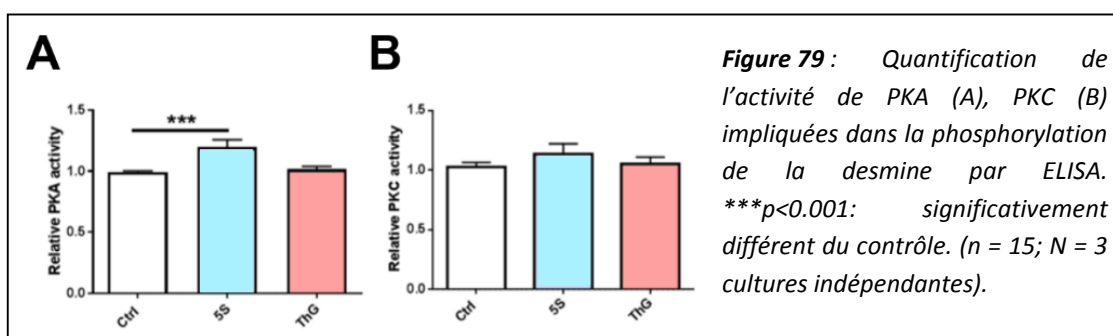
➤ Analyse de l'activité des kinases

Nous avons montré qu'un changement du taux global d'O-GlcNAcylation induisait un changement de phosphorylation de la desmine sans modification des activités des phosphatases. Or, la modulation de phosphorylation d'une protéine peut également provenir d'un changement d'activité de kinases.

- *Analyse de l'état d'activation ou de l'activité des kinases*

C'est dans ce sens que nous avons sélectionné les quatre kinases majeures responsables de la phosphorylation de la desmine : PKA, PKC, PAK et CamKII (*Winter et al. 2014*). Nous avons quantifié les activités de PKA et PKC grâce à une approche ELISA et nous avons déterminé l'état d'activation de CamKII et PAK en utilisant leur taux de phosphorylation, connue comme menant à leur activation.

Comme le montre la **figure 79**, l'activité de PKA augmente à la suite d'une diminution du taux global d'O-GlcNAcylation (traitement par le Ac₄-5S-GlcNAc) ($1,20 \pm 0,06$, $p < 0,001$) comparé au contrôle ($0,99 \pm 0,01$), alors que son activité n'est pas modifiée suivant l'augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation par le traitement au Thiamet G (**figure 79A**). Les activités de PKC et PAK ne sont pas modifiées quelle que soit la variation globale d'O-GlcNAcylation (**figure 79B et figure 80B**). De manière intéressante, nos données montrent qu'une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation suite au traitement par le Thiamet G conduit à une diminution significative de la phosphorylation de CamKII ($0,55 \pm 0,06$, $p < 0,0001$) comparé au contrôle ($1,00 \pm 0,06$) correspondant à une diminution de son niveau d'activité (**figure 80A**), ce qui pourrait expliquer la diminution de la phosphorylation de la desmine.

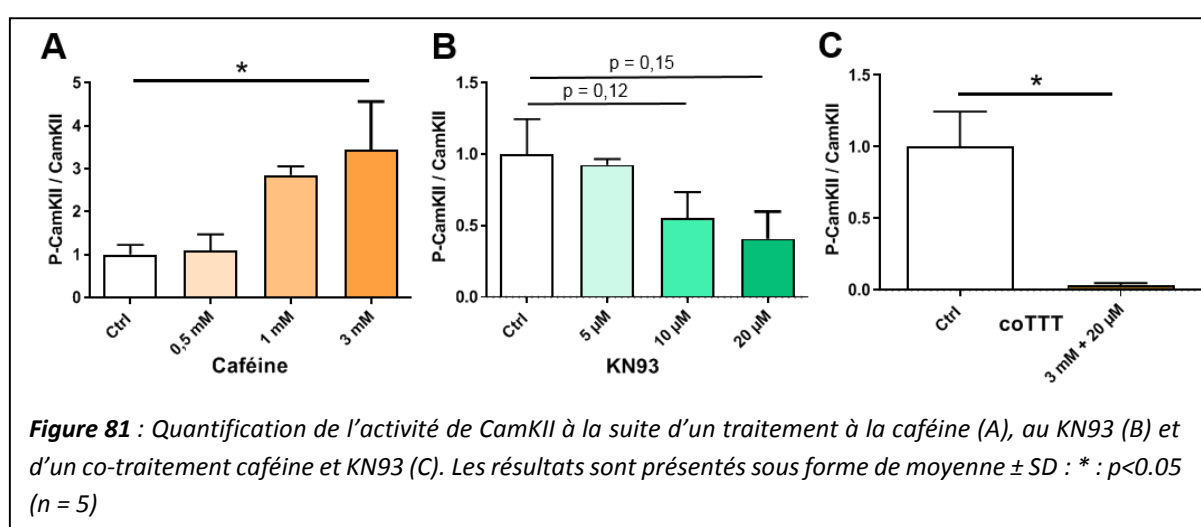


- Validation de l'implication de CamKII
 - Choix, optimisation et validation des traitements pour activer CamKII

Dans le but de valider l'impact de CamKII sur la phosphorylation de la desmine, nous avons choisi de traiter nos cellules avec la caféine et le KN93, connus comme étant respectivement activateur et inhibiteur de la kinase. Dans un premier temps, il a fallu optimiser la dose ainsi que la durée de ces nouveaux traitements dans le but d'augmenter et de diminuer l'activité de CamKII. Puis, nous avons vérifié la viabilité de ces traitements et avons montré qu'ils n'étaient pas cytotoxiques puisque plus de 80% des cellules étaient viables après leur application, dépassant ainsi le seuil critique de viabilité

(Kumar, Nagarajan, et Uchil 2018) (données non présentées). Afin d'être en adéquation avec la durée de nos traitements initiaux (Ac₄-5S-GlcNAc et thiamet G), nous avons également opté pour un traitement sur la nuit pour l'utilisation de ces deux nouvelles molécules.

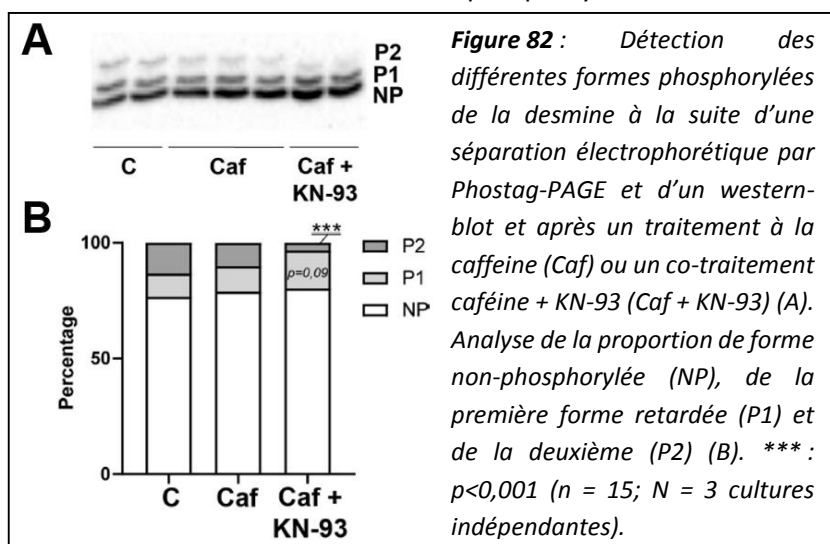
Concernant la dose optimale, nos données montrent que les doses de 0,5 et 1 mM ne modifient pas l'activité de CamKII, seule la dose de 3 mM de caféine permet d'augmenter significativement l'activité de CamKII (**figure 81A**). Bien que les doses testées pour le KN93 (5, 10 et 20 µM) ont tendance à diminuer l'activité de la kinase, aucune donnée n'est significative (**figure 81B**), ce qui pourrait être en partie expliqué par le fait que les traitements ont été appliqués à l'état basal de CamKII. En revanche, lorsque nous avons réalisé un co-traitement de nos cellules en présence de caféine (3 mM) et de KN93 (20 µM), l'activité de CamKII est significativement diminuée (**figure 81C**).



- Impact sur la phosphorylation de la desmine

Puisque que ces nouveaux traitements sont efficaces et permettent de moduler l'activité de CamKII, nous avons voulu voir s'il existait un lien entre la kinase et la phosphorylation de la desmine.

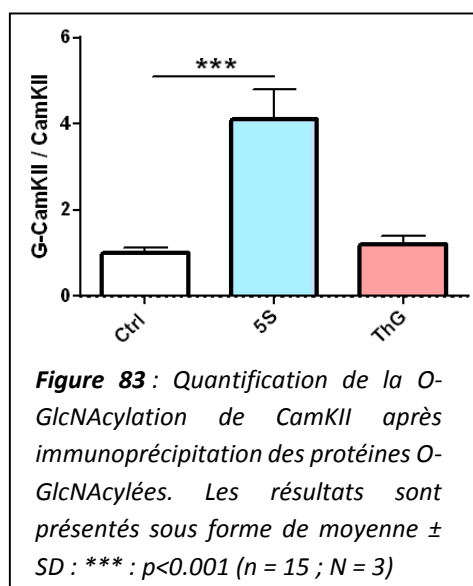
Pour cela, nous avons de nouveau utilisé la technique de Phostag-PAGE à la suite de ces nouveaux traitements. La **figure 82** montre qu'un traitement à la caféine seule, synonyme d'augmentation de l'activité de CamKII, n'a pas d'impact sur la phosphorylation de la



desmine. En revanche, lorsque l'activité de la kinase est diminuée par un co-traitement à la caféine et au KN-93, on observe une tendance à l'augmentation de la première forme retardée (P1) (16,44% contre 10,05% pour le contrôle, $p = 0,09$) et une diminution significative de la deuxième forme retardée et phosphorylée (P2) (3,36% contre 13,33% pour le contrôle, $p < 0,001$). L'ensemble de ces résultats supportent donc le fait que CamKII est impliquée dans la phosphorylation de la desmine, notamment par la diminution de la bande retardée P2.

- *O-GlcNAcylation de CamKII*

Nous nous sommes également intéressés à la O-GlcNAcylation de la protéine CamKII. De manière intéressante, cette dernière kinase est connue comme étant O-GlcNAcylée (*Erickson et al. 2013*). De plus, puisqu'une augmentation de la O-GlcNAcylation par un traitement au Thiamet G



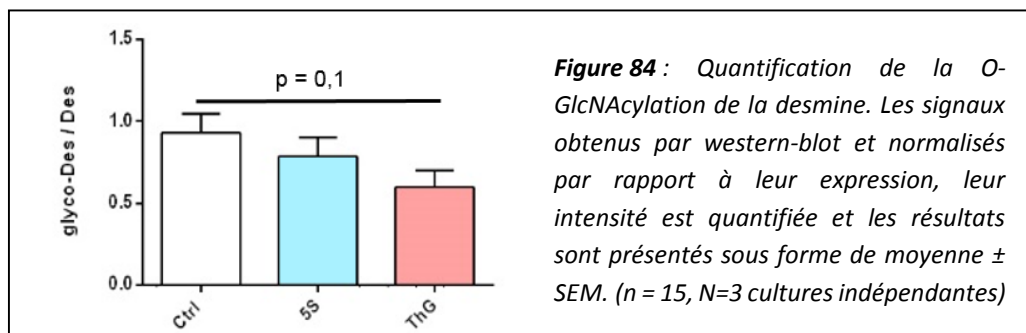
semble avoir un impact sur la phosphorylation de la desmine tout en modulant l'activité de CamKII, nous voulions vérifier s'il y avait un lien entre ces deux éléments. C'est pourquoi nous avons immunoprécipité les protéines O-GlcNAcyées grâce à l'anticorps RL2 avant de réaliser un western-blot dirigé contre l'enzyme CamKII. Nos données montrent qu'un traitement au Thiamet G n'entraîne pas de changement d'O-GlcNAcylation de CamKII. En revanche et de manière surprenante, le Ac₄-5S-GlcNAc provoque une augmentation significative de la MPT de l'enzyme ($4,10 \pm 0,7$, $p < 0,001$) comparé au contrôle ($1,00 \pm 0,13$) (**figure 83**).

D) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation global sur la O-GlcNAcylation de la desmine

a) Analyse de la O-GlcNAcylation de la desmine

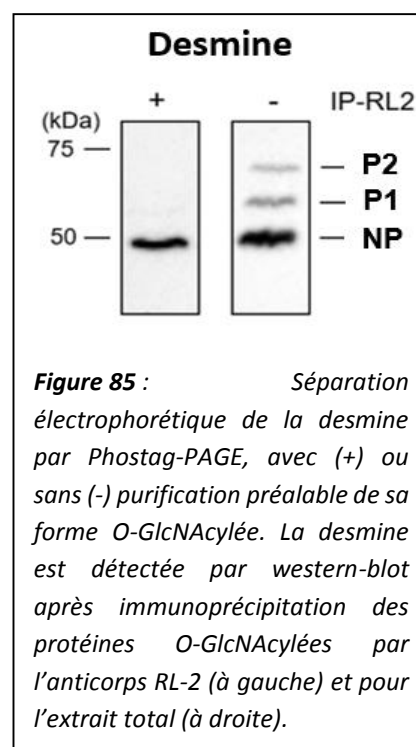
Le premier pas dans l'étude des MPT de cette étude a été d'analyser la phosphorylation. La deuxième modification que nous avons étudié est la O-GlcNAcylation de notre protéine. Pour cela, nous avons réalisé une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps RL2 dans le but de purifier l'ensemble des protéines O-GlcNAcyées. Ces dernières ont ensuite été séparées par SDS-PAGE à la suite duquel nous avons effectué un western-blot avec des anticorps dirigés contre la desmine. Comme le montre la **figure 84**, les deux traitements ne modifient pas significativement le taux d'O-GlcNAcylation de la protéine. Nous observons uniquement une tendance à la diminution du taux d'O-

GlcNAcylation de la desmine après un traitement au Thiamet G ($0,60 \pm 0,11$, $p=0,06$) comparé au contrôle ($0,93 \pm 0,11$).



b) Dynamique O-GlcNAc / phosphorylation de la desmine

Nous avons vu précédemment qu'il existe un lien fort entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation. Cependant, bien que des études se sont intéressées à cette dynamique, peu de recherche se sont focalisées sur les filaments intermédiaires ou la desmine. C'est pourquoi, nous avons analysé conjointement ces deux MPT. Pour cela, nous avons réalisé une immunoprécipitation avec l'anticorps RL-2 afin de purifier les protéines O-GlcNAcylées. Ces protéines ont ensuite été séparées par Phostag PAGE avant de réaliser un western-blot dirigé contre la desmine. Comme le montre la **figure 85**, lorsque la desmine est O-GlcNAcylée, elle n'est pas phosphorylée (à gauche de la figure), contrairement à l'extrait protéique total qui présente une forme non phosphorylée et deux formes retardées correspondant à des formes phosphorylées (P1 et P2).



E) Pattern de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation de la desmine selon les fractions subcellulaires

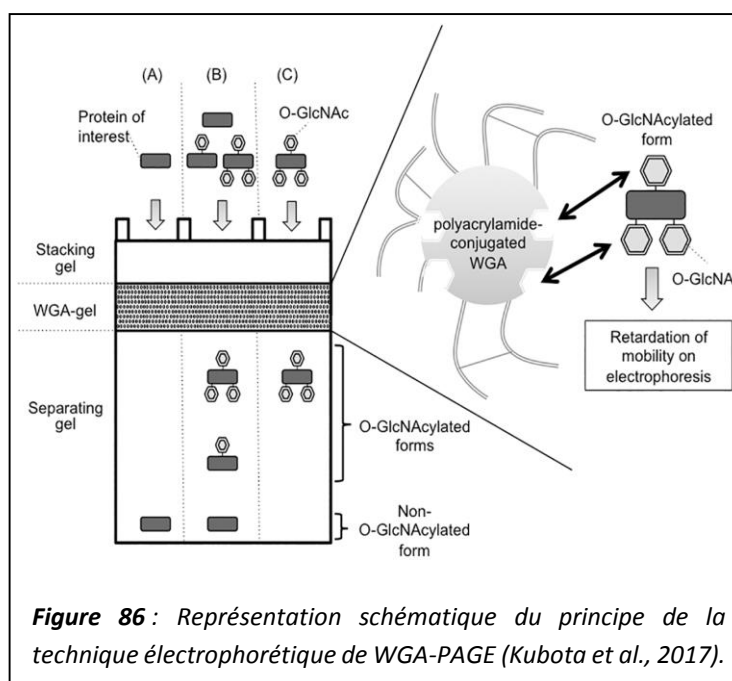
a) Choix et optimisation de la technique WGA-PAGE

Habituellement, la variation d'O-GlcNAcylation sur des protéines spécifiques est quantifiée par western-blot dirigé contre la protéine d'intérêt après une étape d'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées par immunoprécipitation (avec les anticorps CTD110.6 ou le RL2), ou chromatographie d'affinité (avec les lectines WGA et sWGA), suivi de leur détection par western blot (*Ma et Hart 2014*;

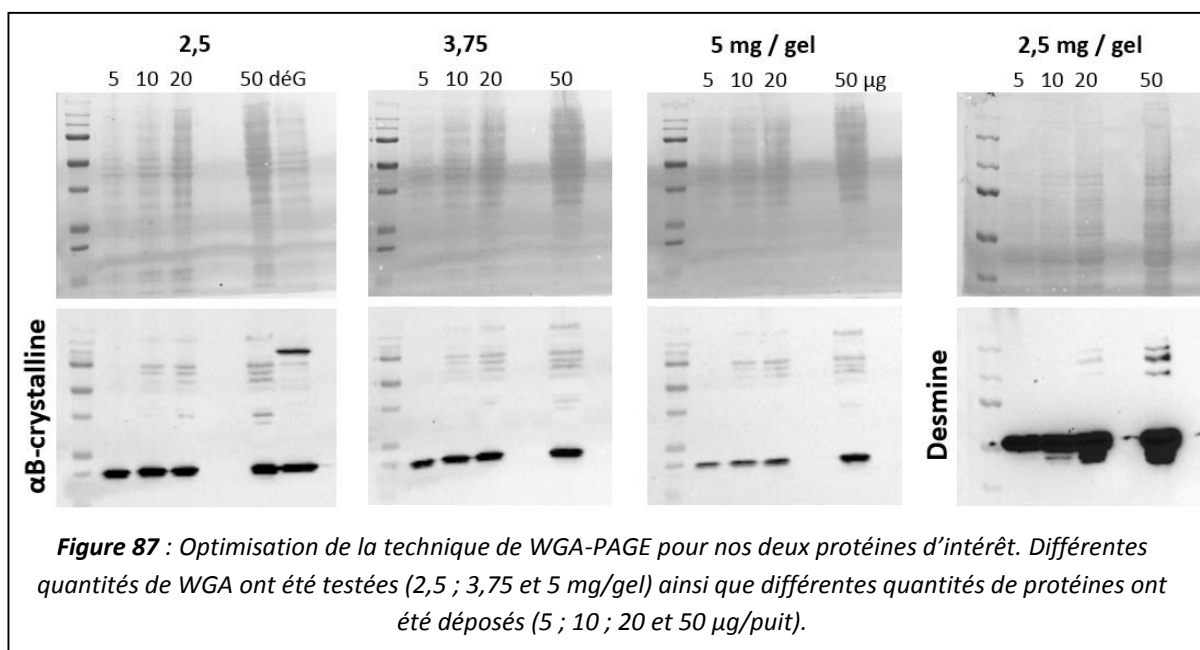
Mueller et al. 2020; Ahmed et al. 2022). Cependant, cette technique permet uniquement de considérer le niveau global d'O-GlcNAcylation, indépendamment du nombre de sites modifiés. Ici, notre but était d'analyser les différents pattern d'O-GlcNAcylation de la desmine selon la fraction subcellulaire étudiée. Pour cela, nous avons eu recours à une technique innovante développée il y a quelques années : la WGA-PAGE (Wheat Germ Agglutinin – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Basée sur le même principe que le Phostag-PAGE, cette méthode présente l'énorme avantage de discriminer les différentes formes d'O-GlcNAcylation et de visualiser le pattern de O-GlcNAcylation d'une protéine cible en analysant plusieurs échantillons simultanément (*Kubota et al., 2017; Fujioka et al., 2018*). De plus, cette approche ne nécessite aucune étape de marquage ou de couplage, et la préparation de l'échantillon en amont de l'électrophorèse se résume à l'étape de dénaturation de l'échantillon protéique dans le tampon Laemmli, comme pour un SDS-PAGE classique. Cette approche électrophorétique repose sur

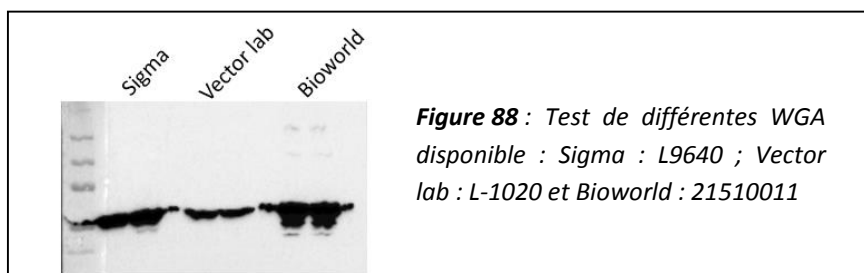
l'utilisation d'un gel d'acrylamide copolymérisé avec la WGA (Wheat Germ Agglutinin, une lectine reconnaissant le motif O-GlcNAc), présentant l'avantage de ne nécessiter aucune étape d'enrichissement protéique préalable. Ce gel WGA, localisé entre des gels de séparation et de migration classiques, contient donc une lectine qui va retarder les différentes formes protéiques selon le degré d'O-GlcNAcylation d'une protéine d'intérêt (**figure 86**).



Nous avons mis en place cette technique au laboratoire et nous l'avons optimisé pour nos protéines d'intérêt, la desmine et son chaperon moléculaire l' α B-cristalline. Dans un premier temps, il a fallu choisir la quantité de WGA optimale au sein du gel (2,5 ; 3,75 ou 5 mg/gel), mais également la quantité de protéine déposée dans les puits (5 ; 10 ; 20 ou 50 μ g/puit) (**figure 87**). D'après la **figure 87**, il semblerait qu'une quantité de 2,5 mg de WGA par gel et une quantité protéique de 20 μ g par puit soient suffisantes pour voir apparaître des bandes retardées de nos deux protéines, correspondant à leurs formes O-GlcNAcylées. Pour finir, nous avons choisi le pourcentage d'acrylamide idéal afin de séparer au mieux les formes glycosylées et non-glycosylées de nos protéines, à savoir 7,5% pour la desmine.



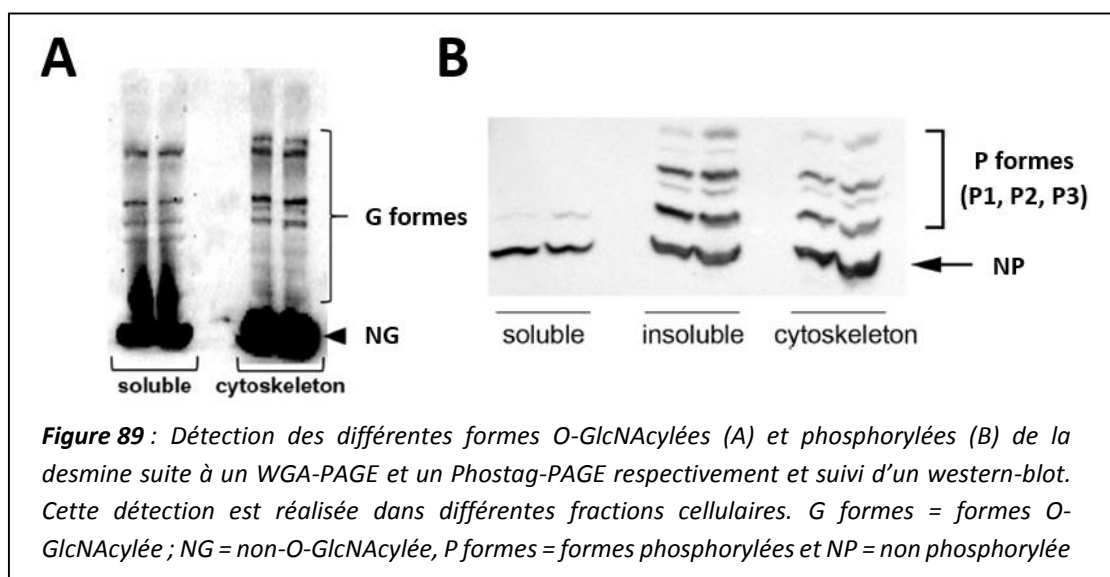
Nous avons également testé différentes références de WGA disponibles sur le marché (Vector lab : L-1020, Sigma : L9640 et Bioworld : 21510011). Comme le montre la **figure 88**, seule la WGA Bioworld permet d'observer des bandes retardées après western-blot. C'est donc cette dernière que nous avons utilisée pour nos analyses.



b) Pattern de la desmine selon la fraction soluble, insoluble et cytosquelettique

La technique WGA-PAGE permet de retarder les protéines O-GlcNAcylées selon leur nombre de groupements O-GlcNAc. De manière intéressante, nous avons montré que le pattern d'O-GlcNAcylation de la desmine est spécifique de la fraction protéique. En effet, plusieurs formes O-GlcNAcylées sont détectées pour la desmine ; de plus, les profils sont différents entre les fractions soluble et cytosquelettique (**figure 89A**) suggérant que la O-GlcNAcylation pourrait impacter la partition de la desmine.

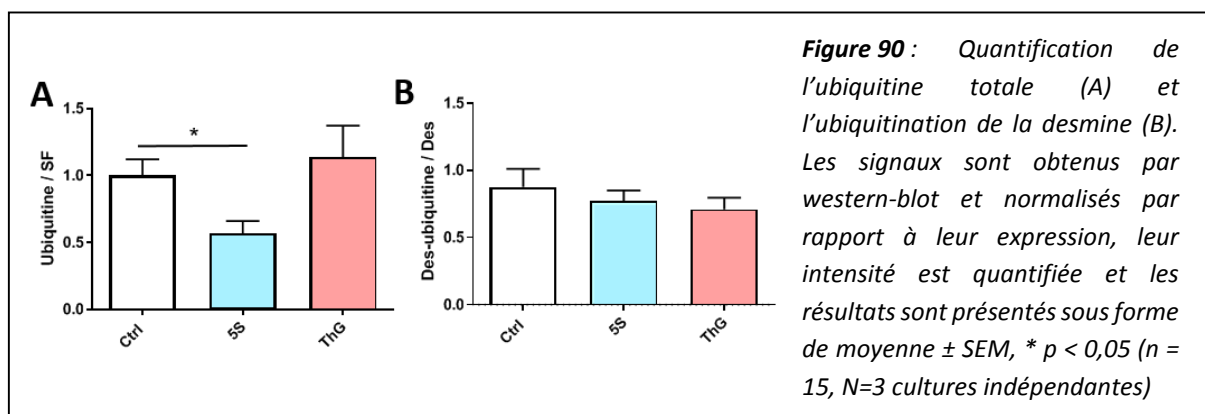
De la même manière, après séparation par Phostag-PAGE, la **figure 89B** montre que plusieurs formes phosphorylées de la desmine peuvent être détectées dans les fractions insoluble et cytosquelettique. En revanche, on observe un très léger signal correspondant à une forme phosphorylée de la desmine dans la fraction soluble.



F) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation global sur l'ubiquitination

Après avoir analysé la phosphorylation et la O-GlcNAcylation, nous avons voulu voir si un changement du taux global d'O-GlcNAcylation pouvait avoir un impact sur l'ubiquitination. Nous avons tout d'abord réalisé un western-blot dirigé comme l'ubiquitine et nous observons que le traitement au Thiamet G ne modifie pas le taux global d'ubiquitine de nos échantillons. En revanche, lorsque le taux global d'O-GlcNAcylation diminue à la suite d'un traitement au Ac₄-5S-GlcNAc, le taux de protéines ubiquitinylées diminue ($0,56 \pm 0,09$, $p < 0,05$) comparé au contrôle ($1,00 \pm 0,12$) (**figure 90A**).

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de la dynamique entre la O-GlcNAcylation et l'ubiquitination, nous avons réalisé une immunoprécipitation des protéines ubiquitinylées avant de réaliser un western-blot dirigée contre la desmine. La **figure 90B** nous montre que peu importe le traitement appliqué et donc le changement global d'O-GlcNAcylation, l'ubiquitination de la desmine reste inchangée.



G) Impact d'un changement du taux global de O-GlcNAcylation sur la desmine : bilan

L'ensemble des données présentées ci-dessus suggèrent que la O-GlcNAcylation induit des changements des propriétés de la desmine (**tableau 4**).

		Myotubes traités au Ac ₄ -5S-GlcNAc	Myotubes traités au Thiamet G	Figures correspondantes
Taux d'O-GlcNAcylation global		⚡*	⚡**	Figure 67
Taux d'ubiquitine global		⚡*	=	Figure 90A
Expression de la desmine		⚡*	=	Figure 68
Fraction	Cytosquelettique	=	⚡*	Figure 72A
	Insoluble	⚡~	=	Figure 72B
Interaction desmine - αB-cristalline		⚡**	=	Figure 92
MPT	O-GlcNAcylation	=	⚡~	Figure 84
	Phosphorylation (P2)	=	⚡**	Figure 74
	Ubiquitination	=	=	Figure 90B
Activités des phosphatases		=	=	Figure 78
Activités des kinases	PKA	⚡***	=	Figure 79A
	PKC	=	=	Figure 79B
	CamKII	=	⚡***	Figure 80A
	PAK	=	=	Figure 80B

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des propriétés de la desmine chez des myotubes traités au Ac₄-5S-GlcNAc et au Thiamet G, conduisant respectivement à une diminution et une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation. Les modifications d'expression, de partition, de modifications post-traductionnelles, d'activités de kinases et phosphatases sont représentés. Les changements sont comparés aux myotubes contrôles. Les niveaux de significativité sont indiqués par *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ou ~ pour 0,05 < p < 0,1.

Pour résumer, quand le taux global d'O-GlcNAcylation diminue suite à un traitement à l'Ac₄-5S-GlcNAc, nous observons une augmentation de l'expression de la desmine, retrouvée préférentiellement au niveau de la fraction insoluble. Nous n'avons pas remarqué de changements de la localisation de la desmine au niveau du cytosquelette. De plus, la O-GlcNAcylation de la desmine reste inchangée. Alors que la phosphorylation de la desmine est impliquée dans l'organisation des filaments intermédiaires (M. Inagaki et al. 1988), nos données suggèrent que la desmine, dont l'expression est augmentée mais pas son niveau de phosphorylation, n'est pas intégrée au cytosquelette mais retrouvée préférentiellement dans la fraction insoluble.

A l'inverse, une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation par le traitement au Thiamet G module la O-GlcNAcylation de la desmine mais il conduit particulièrement à une diminution de sa phosphorylation. De plus, nous avons montré que la O-GlcNAcylation et la phosphorylation sont mutuellement exclusives pour la desmine. Etant donné la dynamique entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation et le fait que ces modifications peuvent potentiellement agir sur la partition, nous avons analysé ces différentes fractions. Nous avons remarqué des profils de phosphorylation différents

entre les fractions soluble et cytosquelettique. Ensemble, ces données suggèrent que la diminution de la phosphorylation de la desmine dans des myotubes traités par le Thiamet G pourrait expliquer la diminution de la desmine associée cytosquelette. De manière intéressante, nous avons déterminé que la diminution de phosphorylation de la desmine ne provenait pas d'un changement d'activité de ses phosphatases mais qu'elle résultait d'un changement d'activité de ses kinases, en particulier CamKII.

Pour valider ceci, nous avons eu recours à deux nouveaux traitements, la caféine et un co-traitement caféine et KN93 qui ont permis respectivement d'augmenter et diminuer l'activité de la kinase. Cette diminution d'activité était corrélée à une diminution de la phosphorylation de la desmine comme nous l'observions avec un traitement au Thiamet G qui induit une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation dans les myotubes (**tableau 5**). L'ensemble de ces données ont fait l'objet d'une publication dans le journal Scientific Reports (*Clayssen, Bastide, et Cieniewski-Bernard 2022*).

	Myotubes traités à la caféine	Myotubes traités à la caféine + KN-93	Figures correspondantes
Activité CamKII	↗*	↘*	Figure 81
Phosphorylation de la desmine (P2)	=	↘***	Figure 82

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des données des myotubes traités à la caféine ou par un co-traitement caféine et KN-93. Les modifications d'activité de CamKII ainsi que la phosphorylation de la desmine sont représentés. Les changements sont comparés aux myotubes contrôles. Les niveaux de significativité sont indiqués par * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

III) Impact d'un changement d'O-GlcNAcylation sur le réseau de desmine

A) Analyse des filaments intermédiaires de desmine

a) Optimisation du marquage filaments intermédiaires desmine

Nous avons tout d'abord optimisé nos protocoles de marquage des filaments de desmine dans des myotubes C2C12. Nous avons testé différents tampons de fixation (méthanol/acétone glacial, tampon BRB80, paraformaldéhyde, glutaraldéhyde), ainsi que des tampons de perméabilisation si nécessaire (Triton X-100, saponine, Igepal). Nous avons également optimisé la solution de blocage (BSA, sérum de chèvre) et les caractéristiques des anticorps (dilution, durée et température d'incubation) (**tableau 6**). Suite à cela, l'acquisition des images a été réalisé à l'aide de la microscopie confocale.

		A	B	C	D
1	Fixation	MeOH/acétone glacial (20 minutes) à RT			
	Lavage	2 x PBS + 0,02% BSA			
	Blocage	PBS + 0,02% BSA + 10% NGS			
	Anticorps	1h, RT			
2	Fixation	4% PFA (15 minutes) à RT			
	Lavage	3 x PBS (5 minutes)			
	Perméabilisation	PBS + 0,1% TX100			
	Blocage	PBS + 0,02% BSA + 10% NGS		PBS + 0,02% BSA	
	Anticorps	1h, RT			
3	Fixation	4% PFA (15 minutes) à RT			
	Lavage	3 x PBS (5 minutes)			
	Perméabilisation	PBS + 0,1% Igepal		PBS + 0,1% Saponine	
	Blocage	PBS + 0,02% BSA + 10% NGS			
	Anticorps	1h, RT			
4	Fixation	4% PFA (15 minutes) à RT			
	Lavage	3 x PBS (5 minutes)			
	Perméabilisation	PBS + 0,1% TX100			
	Blocage	PBS + 0,02% BSA + 10% NGS			
	Anticorps	o/n, 4°C			
5	Fixation	4% PFA (15 minutes) à RT			
	Perméabilisation	PBS + 0,1% TX100			
	Blocage	PBS + 0,02% BSA 10% NGS		PBS + 0,02% BSA	
	Anticorps	1h, 37°C			
6	Rinçage	2 x CB (5 minutes) à 37°C			
	Fixation	PBS + 3% PFA + 0,3% TX100 + 0,05% g'luta (10 minutes)			
	Blocage	PBS + 10% NGS + 0,05% TX100 (1h, RT)			
	Anticorps I	1h30 à 37°C			
	Anticorps II	1h, 37°C			
7	Fixation	BRB80 + 0,25% g'luta (20 - 30 secondes) à RT			
	Perméabilisation	FIX + 0,1% TX100 (10 minutes)			
	Quench	0,1M glycine dans BRB80 (20 - 30 minutes)			
	Blocage	0,2% BSA + 0,1% TX100 / PBS			
	Anticorps I	30 minutes, RT			
	Anticorps II	20 minutes, RT			
8	Fixation	BRB80 + 0,25% g'luta (20 - 30 secondes) à RT			
	Perméabilisation	FIX + 0,1% TX100 (10 minutes)			
	Quench	0,1M glycine dans BRB80 (20 - 30 minutes)			
	Blocage	0,2% BSA + 0,1% TX100 / PBS			
	Anticorps I	o/n, 4°C			
	Anticorps II	20 minutes, RT			
Dilution Ac I		1/100e	1/250e	1/100e	1/250e
Dilution Ac II		1/200e			

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des différentes conditions de marquage testées (fixation, perméabilisation, blocage, anticorps, temps d'incubation, lavages, etc)

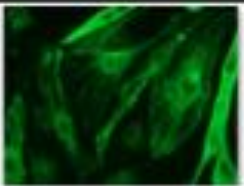






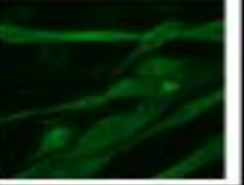


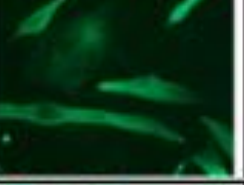




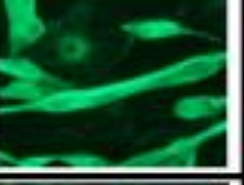


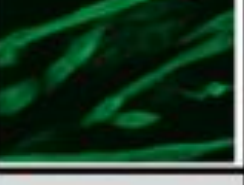




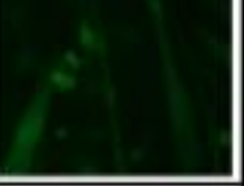
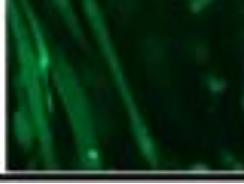
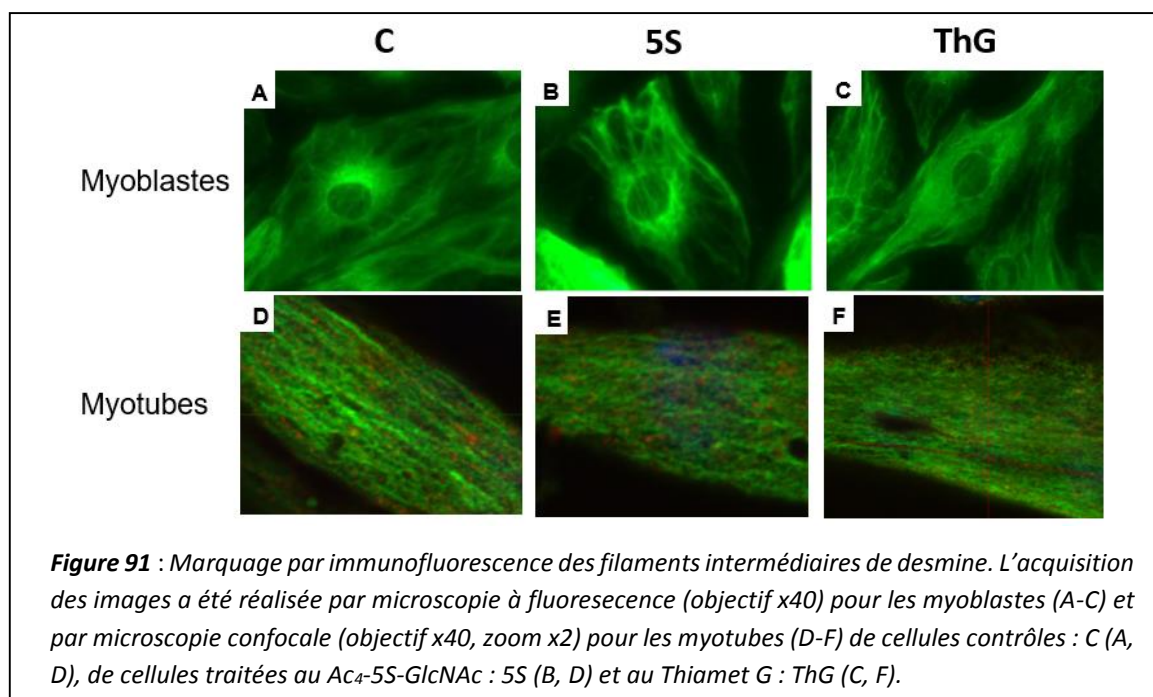
	A	B	C	D
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes images obtenues après le test des différentes conditions de marquage (grossissement x40).

b) Analyse des filaments par microscopie confocale

Suite à l'optimisation de ce marquage, nous avons choisi l'option 1 (**tableau 6 et 7**). Nous avons ainsi montré que l'organisation des filaments intermédiaires de desmine était modifiée suite aux changements du taux global d'O-GlcNAcylation. La **figure 91** présente des images représentatives de cette modification d'organisation sur des myoblastes et des myotubes contrôles et traités par le Ac₄-5S-GlcNAc et le Thiamet G.

Dans les myoblastes contrôles (C), on observe de fins filaments de desmine avec un marquage intense à proximité du noyau. En revanche, les filaments semblent plus épais et plus denses dans les cellules traitées au Ac₄-5S-GlcNAc (5S) alors que le marquage est plus diffus et moins marqué autour du noyau dans les myoblastes traités au Thiamet G (ThG). Dans les myotubes, les filaments de desmine semblent être également remodelés, alors qu'ils sont moins parallèles et orientés dans les myotubes traités au Ac₄-5S-GlcNAc comparé au contrôle. Comme nous l'observons pour les myoblastes, les filaments de desmine sont également diffus dans les myotubes traités au Thiamet G.

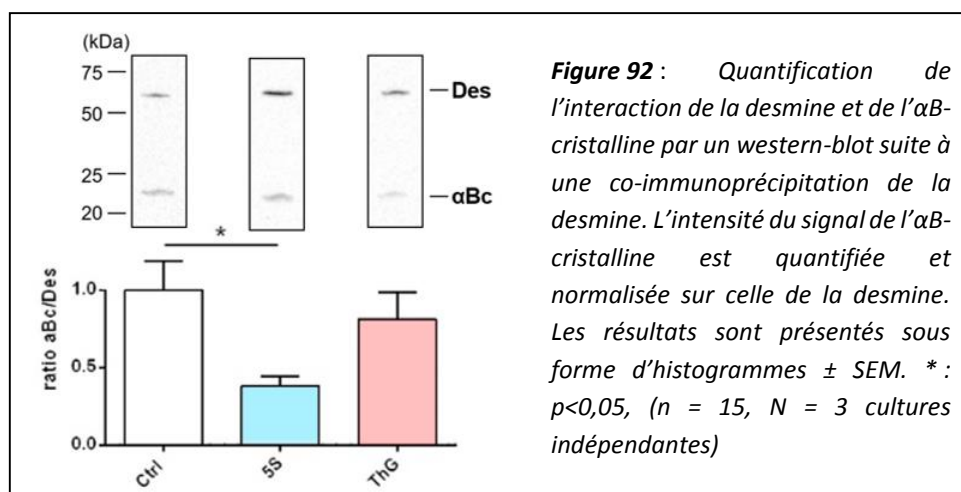


L'ensemble de ces données suggèrent donc que les FI de desmine sont remodelés consécutivement aux changements du taux global d'O-GlcNAcylation. L'une des hypothèses permettant d'expliquer des remaniements structuraux est que des interactions entre le desmine et certains partenaires protéiques pourraient être modulés consécutivement aux traitements des myotubes par les inhibiteurs de l'OGT et de l'OGA.

B) Analyse de l'interactome de la desmine

a) Données préliminaires

Nous savons que la O-GlcNAcylation pourrait intervenir dans la modulation des interactions protéine – protéine. C'est pourquoi, dans un premier temps nous avons déterminé s'il existait des changements d'interaction avec un partenaire majeur de la desmine : son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline. Pour cela, nous avons eu recours à la technique de co-immunoprécipitation qui permet de purifier la desmine associée à ses partenaires protéiques, puis de réaliser un western-blot dirigé contre la desmine et son chaperon pour quantifier cette interaction en fonction de nos deux traitements. Comme le montre la **figure 92**, le ratio α B-cristalline / desmine représentant leur degré d'interaction diminue significativement de 61,92% en présence de Ac₄-5S-GlcNAc ($p < 0,05$) mais n'est pas modifié après un traitement au Thiamet G.



Ces données préliminaires suggèrent donc que l'interactome de la desmine pourrait être modifié consécutivement à l'augmentation ou la diminution du taux global de O-GlcNAcylation. Cependant, l'interactome de la desmine est vaste (*Hnia et al. 2015*) et certaines interactions avec différents partenaires protéiques pourraient être en lien avec l'organisation et la réorganisation des filaments intermédiaires et donc du cytosquelette sarcomérique. Afin mieux comprendre les mécanismes et les interactions protéine – protéine qui pourraient être à l'origine de ces changements d'architecture des FI de desmine, nous avons eu recours à une stratégie protéomique sans à priori afin d'identifier des changements d'interaction entre la desmine et des protéines partenaires consécutivement aux différents traitements appliqués aux cellules C2C12 différenciées en myotubes.

b) Mise en place et optimisation d'un protocole d'analyse protéomique

➤ Stratégie globale

Nous avons alors considéré si des changements du taux global d'O-GlcNAcylation pouvaient mener à des changements de l'interactome de la desmine afin d'expliquer ses changements des propriétés, en particulier les changements d'organisation des filaments intermédiaires. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie protéomique basée sur une approche par gel 2D à la suite d'un enrichissement de l'interactome de la desmine par co-immunoprécipitation en extrait natif (*H. Kim et al. 2007; Krause 2006; Lee, Saraygord-Afshari, et Low 2020*) (**figure 93**)

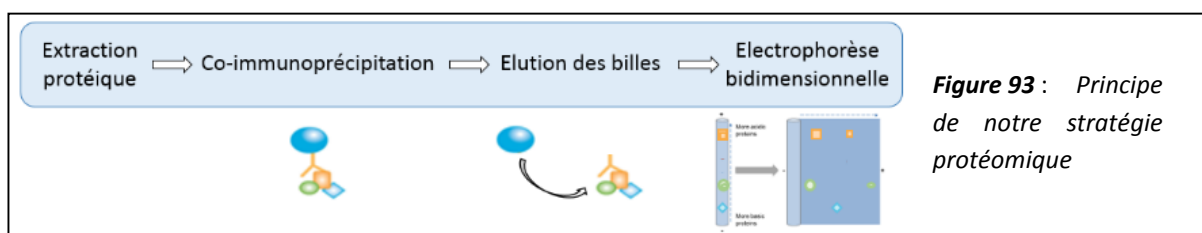


Figure 93 : Principe de notre stratégie protéomique

➤ Optimisation du protocole de co-immunoprécipitation

Brièvement, après extraction des protéines en conditions non dénaturantes, la desmine est précipitée associée à ses partenaires protéiques via une co-immunoprécipitation, puis éluée des billes magnétiques. Pour cette dernière étape, nous avons testé différents protocoles d'éluat (Laemmli, glycine, SEB : SDS-elution buffer, KCl-HCl, Soft et urée-CHAPS) (*Antrobus et Borner 2011; De Souza 2013*) dont la composition est décrite dans le **tableau 8** afin de choisir le tampon permettant un meilleur ratio quantité dans l'éluat / quantité sur les billes (**figure 94**), mais également d'être compatible avec l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle envisagée pour cette étude (**figure 95**).

Nom	Composition
Laemmli	<i>i.e Matériel et méthodes</i>
Glycine	50 mM Glycine + quelques gouttes de Tris base (1M) pH 10
SEB	Tris/HCl pH 7,5, 2% SDS, 10% glycérol, 0,5 mM EDTA, 100 mM DTT
KCl-HCl	0,2 M KCl pH 1,5
Soft	0,2% SDS, 0,1% Tween-20
Urée-CHAPS	8 M urée, 4% CHAPS, 130 mM DTT

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différents tampons d'éluat utilisés pour l'optimisation du protocole de co-immunoprécipitation.

La **figure 94** montre que la desmine n'est pas du tout retrouvée au sein de la fraction éluee pour les tampons « soft », glycine et KCl-HCl : c'est pourquoi nous avons choisi de les éliminer tout comme le tampon urée-CHAPS pour lequel les signaux correspondant à la fraction retenue étaient encore très importants, suggérant donc que la desmine n'était que très peu éluee.

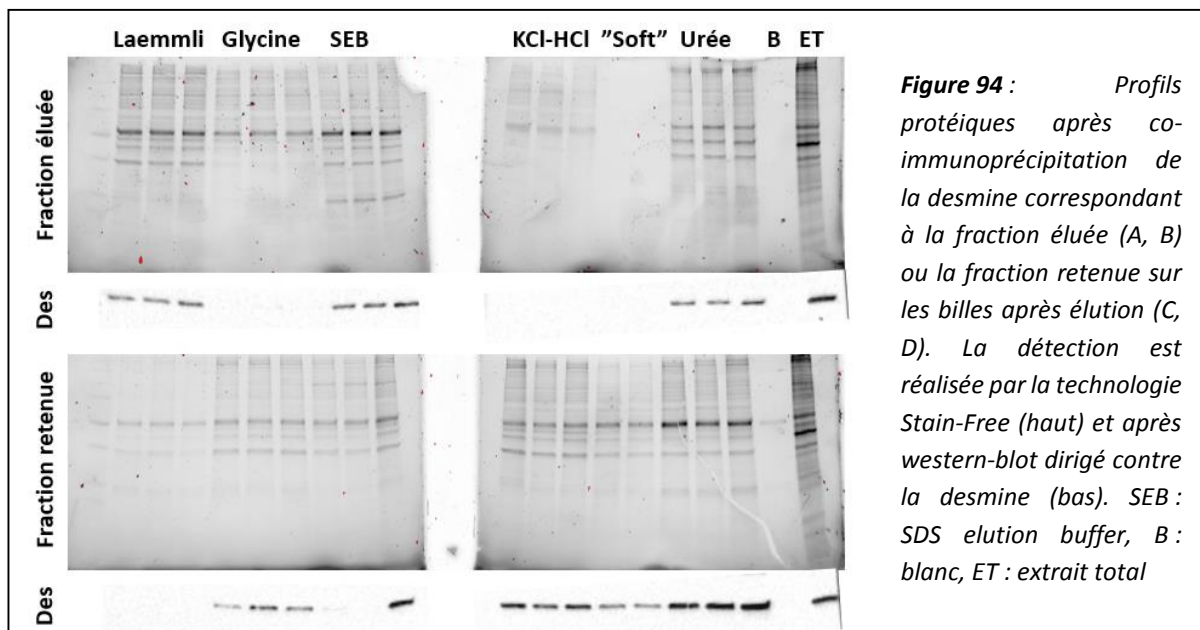


Figure 94 : Profils protéiques après co-immunoprécipitation de la desmine correspondant à la fraction éluee (A, B) ou la fraction retenue sur les billes après élution (C, D). La détection est réalisée par la technologie Stain-Free (haut) et après western-blot dirigé contre la desmine (bas). SEB : SDS elution buffer, B : blanc, ET : extrait total

Nous avons également analysé les fractions éluées suivant les différents protocoles par électrophorèse bidimensionnelle (**figure 95**). Ces données corroborent les résultats obtenus par SDS-PAGE, à savoir une élution efficace de la desmine et son interactome avec le tampon SDS (qui est compatible avec la 2D, comme on peut le voir sur la **figure 95**), et une efficacité moindre pour les autres tampons d'élution. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur le tampon SDS pour la suite des expérimentations. s

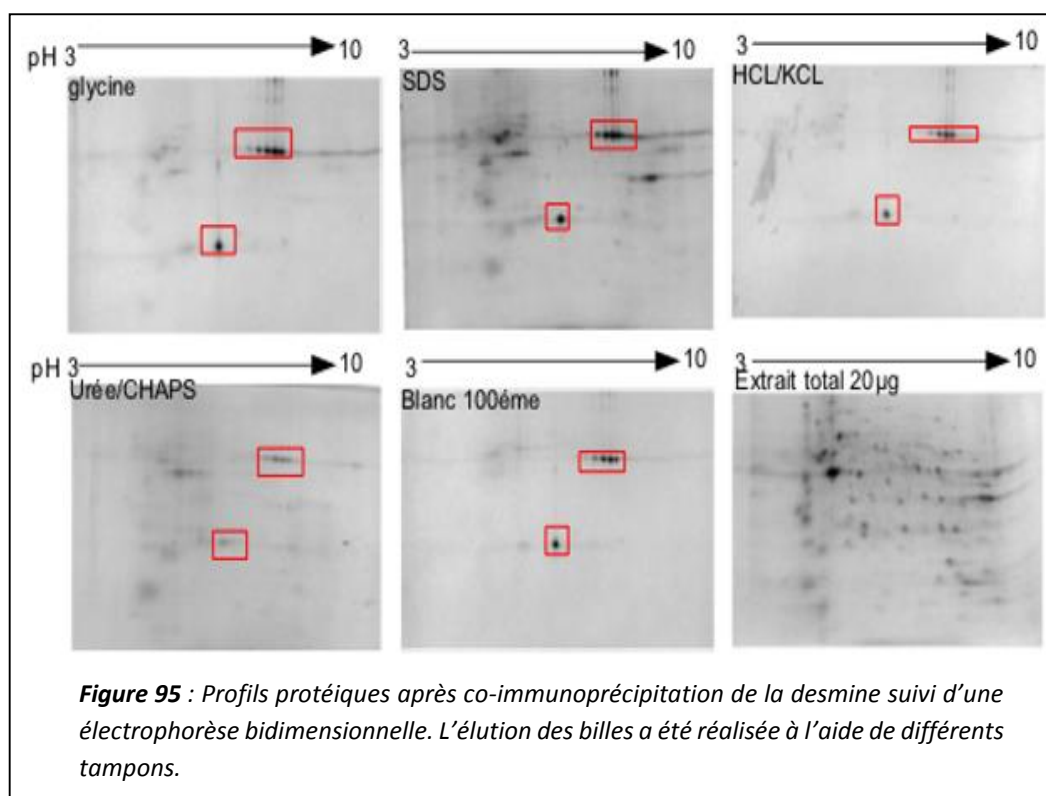
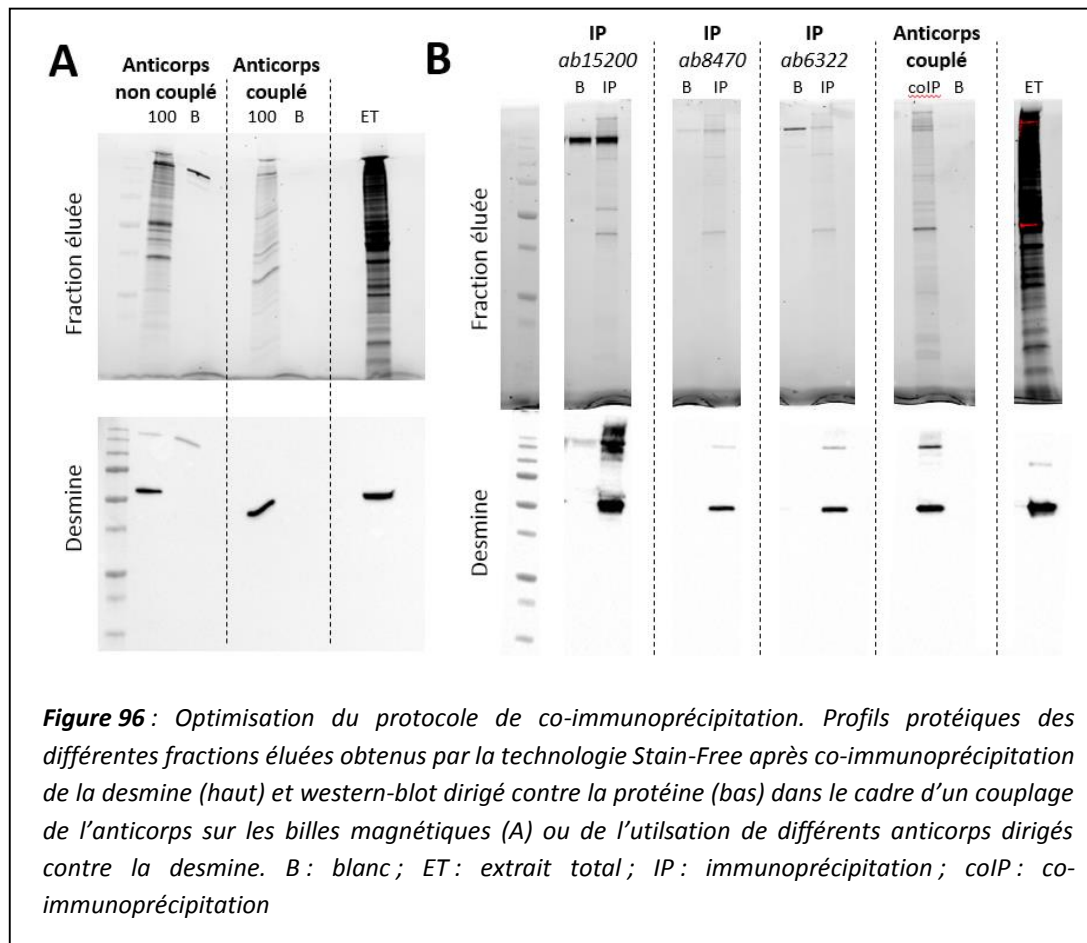


Figure 95 : Profils protéiques après co-immunoprécipitation de la desmine suivi d'une électrophorèse bidimensionnelle. L'élution des billes a été réalisée à l'aide de différents tampons.

Sur cette **figure 96** nous pouvons également remarquer que le « blanc » expérimental (correspondant au protocole expérimental appliqué sans échantillon protéique) présente des signaux importants correspondant aux chaînes d'immunoglobulines provenant de l'immunoprécipitation. C'est pourquoi nous avons testé différents anticorps dirigés contre la desmine pour réaliser notre immunoprécipitation (références Abcam ab15200, ab8470 et ab6322); nous avons également directement couplé notre anticorps sur les billes magnétiques (**figure 96**) et optimisé ce protocole de couplage.



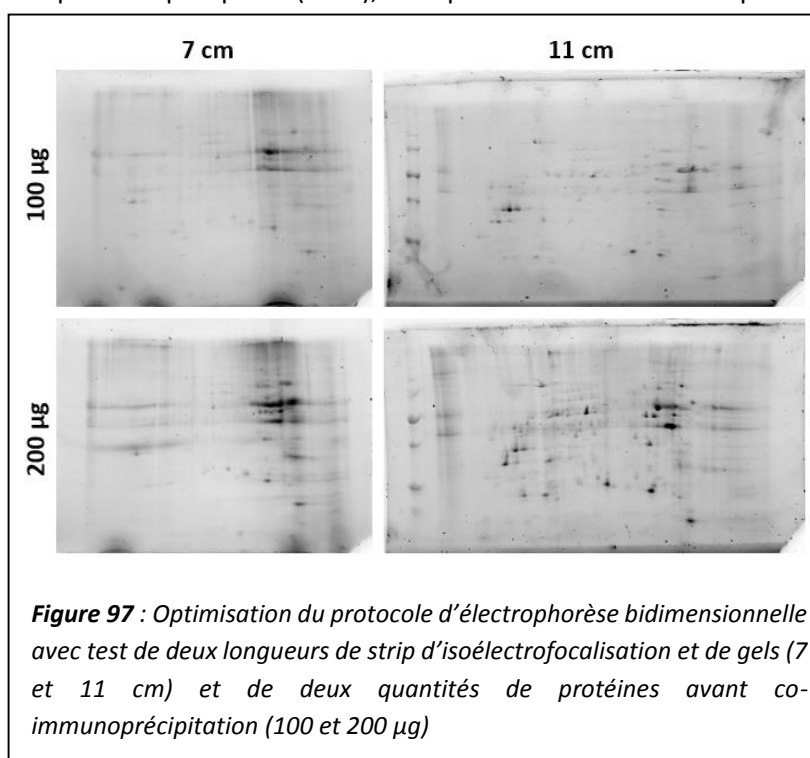
Dans un premier temps, nous remarquons que le fait de coupler notre anticorps directement sur les billes magnétiques permet de s'affranchir des signaux correspondant aux immunoglobulines dans le blanc expérimental et donc dans notre échantillon (**figure 96A**). De plus, bien que légèrement plus importants avec le protocole reposant sur l'utilisation des billes magnétiques non couplées à l'anticorps, les signaux correspondant à la fraction protéique éluee sont tout de même bien visibles et suffisants avec les billes magnétiques couplées à l'anticorps. La **figure 96B** permet de faire la comparaison entre les différents anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation. On remarque que la fraction protéique éluee est sensiblement la même pour les trois anticorps. En revanche, le signal correspondant à la desmine après un western-blot est beaucoup plus net pour les anticorps ab8470 et

ab6322. C'est pourquoi, nous avons fait le choix de l'anticorps ab6322 que nous utilisons en routine au laboratoire afin de le coupler aux billes magnétiques pour cette étape de co-immunoprécipitation en vue d'obtenir les meilleurs résultats.

➤ Optimisation de la séparation électrophorétique

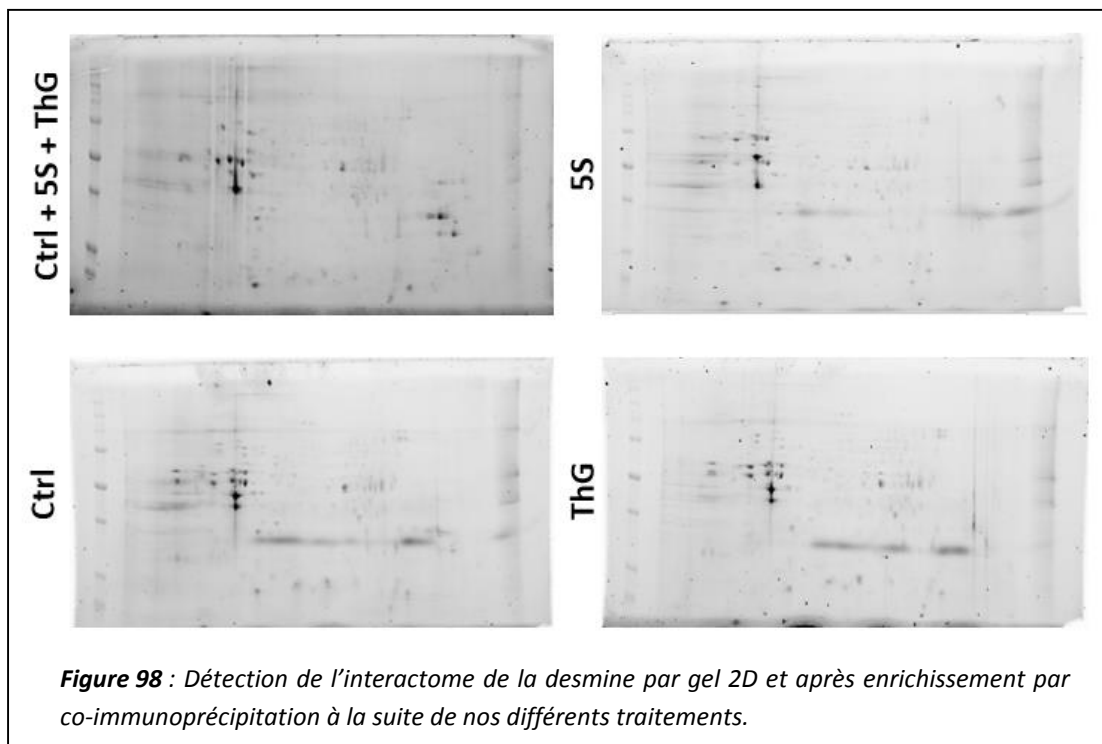
De plus, afin d'obtenir les images les plus nettes et les spots les plus séparés possibles, nous avons également optimisé ce protocole en termes de taille de strip d'isoélectrofocalisation mais également selon la taille du gel choisi (7 et 11 cm et petit et grand gel respectivement) (**figure 97**). La **figure 97** nous montre que les signaux sont bien plus nets et mieux séparés lorsque les languettes et les gels sont plus grands (11 cm) comparés au plus petits (7 cm), mais pourrait nécessiter une quantité plus importante de protéines.

Nous avons donc testé deux quantités protéiques différentes pour réaliser la co-immunoprécipitation de la desmine à ses partenaires protéiques à savoir 100 et 200 µg de protéines. On observe des spots plus réguliers et moins de bruit de fond lorsque la quantité protéique est inférieure. Notre choix s'est donc porté sur une quantité protéique de 100 µg et une languette et un gel de 11 cm.



c) Analyse protéomique différentielle de l'interactome de la desmine des myotubes C2C12 traités par l'Ac4-5S-GlcNAc ou la Thiamet G

Les gels correspondants à nos différentes conditions expérimentales sont représentés sur la **figure 98**. Ces gels ont été comparés à un gel de référence contenant les trois conditions (« Master gel », **figure 98**) à l'aide du logiciel SameSpots. Les premières analyses laissent à penser que certains spots seraient différents selon le traitement appliqué.



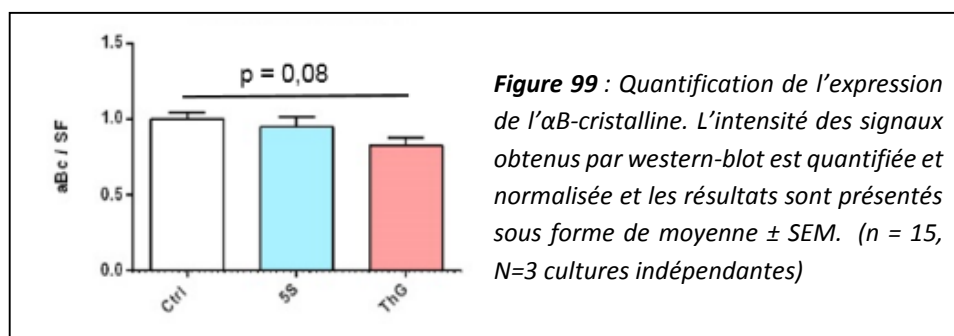
Une fois l'analyse totalement terminée, les spots différentiels seront coupés du gel et soumis à une digestion protéolytique. L'analyse par spectrométrie de masse des peptides ainsi digérés permettra l'identification des protéines différentielles constitutives de l'interactome de la desmine.

IV) Impact de changement d'O-GlcNAcylation sur l' α B-cristalline

Puisque nous avons effectué nombreuses analyses sur la desmine, nous avons également réalisé en parallèle ces mêmes expériences sur son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline afin d'avoir des données complètes sur l'impact de la O-GlcNAcylation sur ces deux protéines.

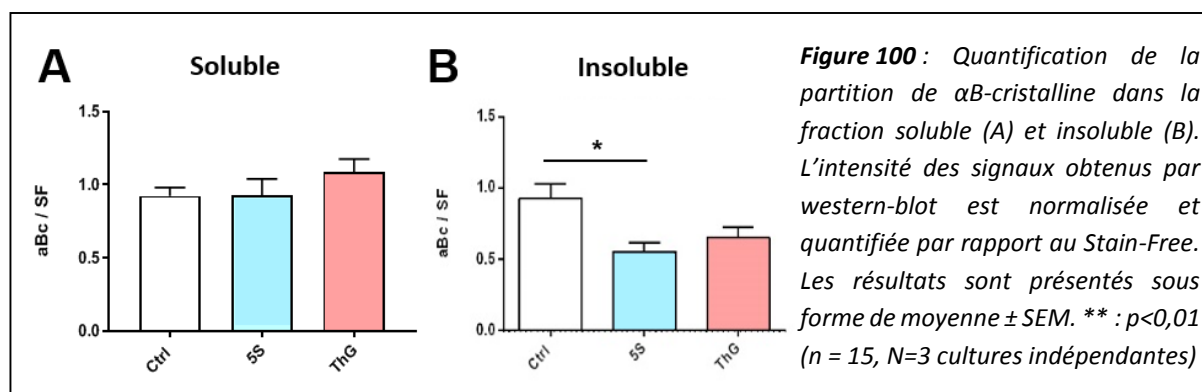
A) Expression

A l'inverse des résultats que nous avons obtenus pour la desmine, nous observons des réponses différentes pour l' α B-cristalline puisque le traitement par le Ac₄-5S-GlcNAc ne modifie pas l'expression de cette protéine tandis que le Thiamet G induit une tendance à la diminution de cette expression ($0,83 \pm 0,05$; $p = 0,08$) comparé au contrôle ($1,00 \pm 0,04$) (**figure 99**).



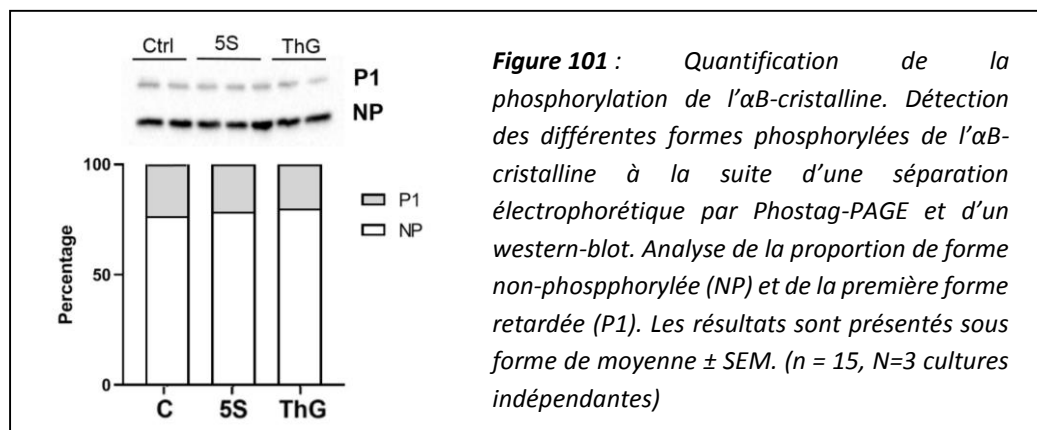
B) Partition

Alors qu'un traitement au Thiamet G ne modifie pas la distribution de la protéine au sein de la fraction soluble ou insoluble (**figure 100A et B**), le traitement au Ac_4 -5S-GlcNAc diminue significativement la présence de l' α B-cristalline dans la fraction insoluble ($0,70 \pm 0,14$; $p < 0,5$) de l'ordre de 40% comparé au contrôle ($1,00 \pm 0,14$) sans changement au niveau de la fraction soluble.

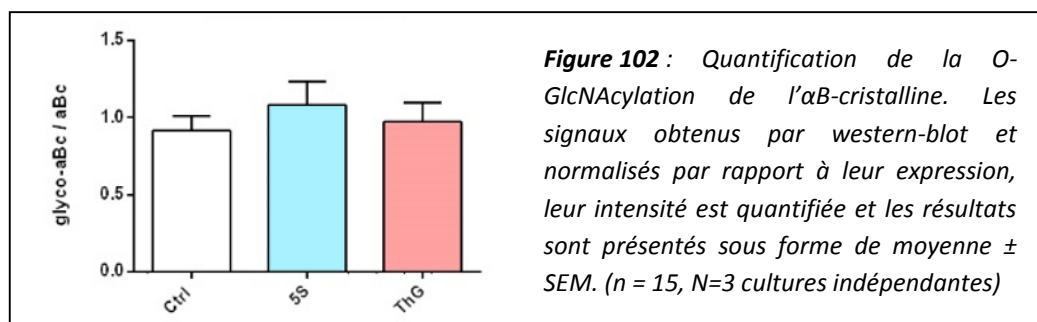


C) Modifications post-traductionnelles : phosphorylation et O-GlcNAcylation

Comme nous l'avons fait pour la desmine, nous nous sommes intéressés à l'impact de changement d'O-GlcNAcylation sur les MPT de l' α B-cristalline. Pour analyser la phosphorylation de la protéine, nous avons réalisé un Phostag-PAGE suivi d'un western-blot. Nos données montrent qu'un changement du taux global d'O-GlcNAcylation suite aux traitements par le Ac_4 -5S-GlcNAc ou le Thiamet G ne modifie pas la phosphorylation de l' α B-cristalline. (**figure 101**).



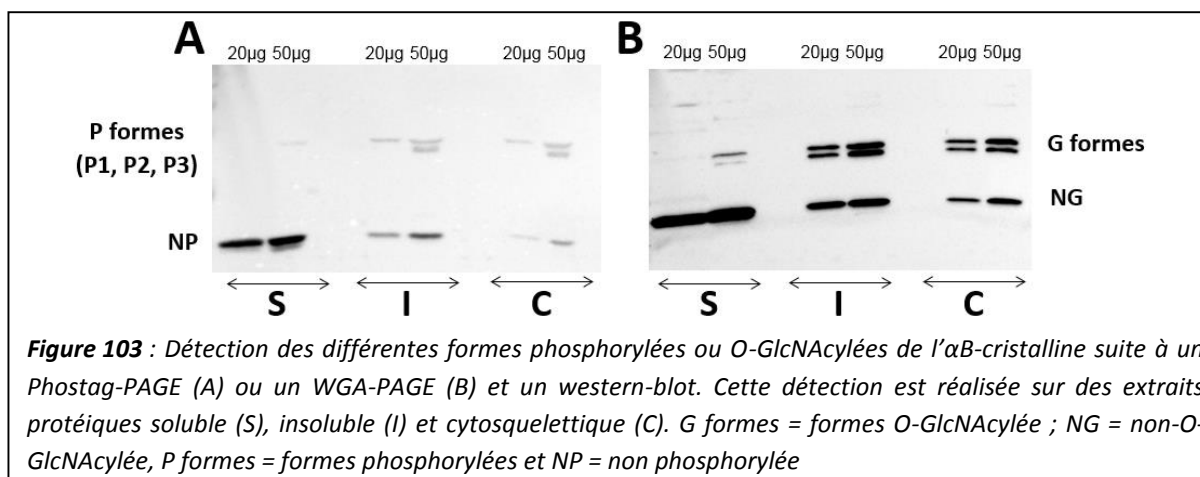
Pour analyser la O-GlcNAcylation de l' α B-cristalline, nous avons réalisé une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps RL2 dans le but de purifier l'ensemble des protéines O-GlcNAcylées. Ces dernières ont ensuite été séparées par SDS-PAGE à la suite duquel nous avons effectué un western-blot avec un anticorps dirigés contre l' α B-cristalline. Comme le montre la **figure 102**, les deux traitements ne modifient pas significativement le taux d'O-GlcNAcylation de la protéine.



D) Pattern selon les fractions

Pour aller plus loin et comprendre comment les MPT pourrait impacter la distribution subcellulaire de la chaperonne, nous avons analysé sa phosphorylation et son O-GlcNAcylation dans les différentes fractions à l'aide des séparations électrophorétique Phostag-PAGE et WGA-PAGE. Comme nous l'avons observé pour la desmine, il semblerait que les modifications de l' α B-cristalline impactent sa localisation puisqu'on observe des patterns de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation différents selon les fractions étudiées.

En effet, la phosphorylation de l'αB-cristalline caractérisée par les bandes retardées semble plus marquée dans la fraction insoluble et cytosquelettique que dans la fraction soluble (Figure 103A). De la même manière, la protéine semble moins fortement O-GlcNAcylée dans la fraction soluble puisque le signal des bandes retardées est plus faible que ce qu'on peut observer dans la fraction insoluble et cytosquelettique (figure 103B).



E) Impact d'un changement du taux global d'O-GlcNAcylation sur l'αB-cristalline : bilan

		Myotubes traités au Ac ₄ -5S-GlcNAc	Myotubes traités au Thiamet G	Figures correspondantes
Taux d'O-GlcNAcylation global		⚡*	⚡**	Figure 67
Expression de l'αB-cristalline		=	⚡~	Figure 99
Fraction	Soluble (CLB)	=	⚡*	Non montré
	Soluble (DSB)	=	=	Figure 100A
	Insoluble	⚡*	=	Figure 100B
Interaction desmine - αB-cristalline		⚡**	=	Figure 92
MPT	Phosphorylation	=	=	Figure 101
	O-GlcNAcylation	=	=	Figure 102

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des propriétés de l'αB-cristalline chez des myotubes traités au Ac₄-5S-GlcNAc et au Thiamet G, conduisant respectivement à une diminution et une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation. Les modifications d'expression, de partition, de modifications post-traductionnelles sont représentées. Les changements sont comparés aux myotubes contrôles. Les niveaux de significativité sont indiqués par *p<0,05, **p<0,01 ou ~ pour 0,05 < p < 0,1.

Pour résumer, un changement du taux global d'O-GlcNAcylation va avoir différentes conséquences sur l'αB-cristalline. En effet une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation induit par le Thiamet G provoque une tendance à la diminution de l'expression de la protéine mais diminue significativement sa présence au sein du compartiment soluble. En revanche, il n'induit pas de changement de son O-GlcNAcylation, de sa phosphorylation et de sa partition au sein de la fraction insoluble.

A l'inverse, le traitement au Ac₄-5S-GlcNAc qui provoque une diminution du taux global d'O-GlcNAcylation induit une diminution significative de la présence de la chaperonne au sein du matériel insoluble sans modifier son niveau protéique global ou sa présence dans le compartiment soluble. Ce traitement n'induit pas de changement au niveau des MPT de l' α B-cristalline (phosphorylation et O-GlcNAcylation) mais il diminue significativement son interaction avec la desmine.

DISCUSSION

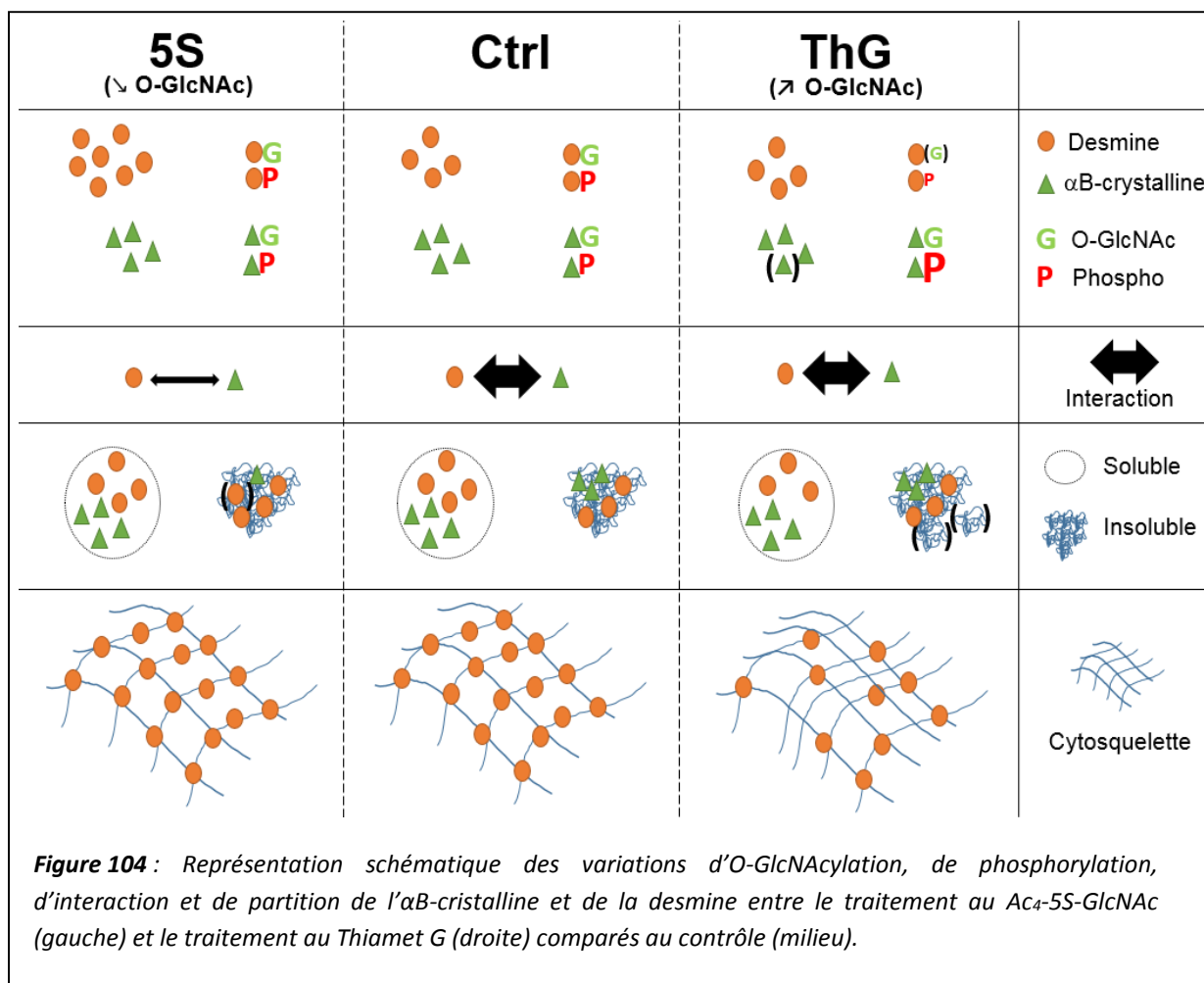
I) La modulation du taux global de la O-GlcNAcylation : une approche permettant de moduler la phosphorylation de la desmine

L'un des objectifs de mes travaux de thèse était de comprendre le rôle de la O-GlcNAcylation sur certaines propriétés de la desmine. Pour cela, il était nécessaire de moduler de manière efficace le taux global d'O-GlcNAcylation dans des cellules musculaires squelettiques C2C12 différenciées en myotubes. Des recherches dans la bibliographie ainsi que des données préliminaires du laboratoire, nous ont aidées à faire notre choix sur les molécules à utiliser.

Nous avons alors opté pour l'utilisation du Thiamet G, un des inhibiteurs de l'OGA les plus utilisés, ayant démontré son efficacité dans de nombreux travaux (*Olivier-Van Stichelen et al. 2014; Decourcelle et al. 2020; Jiménez-Castillo et al. 2022*). Celui-ci permet d'augmenter le taux d'O-GlcNAcylation et de diminuer l'activité de l'OGA de manière dose-dépendante dans notre modèle de myotubes, que ce soit pour l'ensemble des protéines ou bien pour les protéines myofilamentaires (*Lambert et al. 2016*). A l'inverse, pour diminuer le taux d'O-GlcNAcylation, nous avons appliqué le Ac₄-5S-GlcNAc, un inhibiteur de l'OGT (*Vocadlo 2012*). Ce composé, capable de traverser la membrane plasmique, va intégrer la voie de biosynthèse des hexosamines pour former l'UDP-5S-GlcNAc, une molécule similaire à l'UDP-GlcNAc qui pourra être utilisée comme substrat par l'OGT (*Gloster et al. 2011*). Utilisée dans de nombreuses études, cette molécule n'est pas cytotoxique pour les cellules et n'inhibe pas l'OGA (*Fardini et al. 2015; Ferrer et al. 2017*). Après avoir modifié efficacement le taux global de la O-GlcNAcylation, nous nous sommes intéressés aux différentes propriétés de la desmine, et en parallèle, à celles de son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline, telles que leur niveau protéique, leur distribution au sein de différentes fractions cellulaires, leur interaction mais également leurs modifications post-traductionnelles. De manière intéressante, alors que nous nous attendions à obtenir des répercussions opposées de ces deux traitements, nous avons observé des changements différentiels des propriétés de la desmine selon le changement global d'O-GlcNAcylation. Cela suggère que l'inhibition ciblée de l'OGT et l'OGA a conduit à une réponse adaptative différentielle des myotubes.

Tout d'abord, et grâce aux différents protocoles d'extraction différentielle que nous avons préalablement optimisés au laboratoire, nous avons mis en évidence qu'un traitement par le Thiamet G diminue significativement la présence de la desmine au cytosquelette alors que son niveau protéique global reste inchangé. Nous avons également montré que le traitement par le Ac₄-5S-GlcNAc induit une diminution significative de l' α B-cristalline dans la fraction insoluble tandis qu'il entraîne également une tendance à l'augmentation de la desmine dans cette même fraction (**figure 104**). Cette différence de distribution des protéines au sein de la fraction insoluble à la suite d'une diminution globale de la

O-GlcNAcylation par le Ac₄-5S-GlcNAc pourrait être liée à leur interaction. En effet, nous avons démontré que ce même traitement entraîne une diminution de l'interaction tandis que le Thiamet G n'a pas d'effet. Pour rappel, l'interaction entre la desmine et son chaperon peut être bénéfique ou bien délétère pour la cellule selon les conditions cellulaires. Cette diminution d'interaction observée de l'αB-cristalline avec la desmine pourrait expliquer l'augmentation de la desmine au sein de la fraction insoluble tandis que l'αB-cristalline diminue dans cette même fraction. En effet, l'αB-cristalline ne jouerait plus son rôle de chaperonne vis-à-vis de la desmine dont l'expression est augmentée, et qui s'agrègerait donc dans le matériel insoluble.



De manière surprenante, l'impact des deux traitements n'ont pas eu le même effet sur nos protéines que sur le taux protéique global. Alors que nous nous attendions à ce que le Thiamet G et le Ac₄-5S-GlcNAc augmente et diminue respectivement la O-GlcNAcylation de nos protéines, ce ne fut pas le cas. En effet, le traitement au Ac₄-5S-GlcNAc n'entraîne aucun changement de cette MPT de nos deux protéines d'intérêt : le Thiamet G ne change pas la O-GlcNAcylation de l'αB-cristalline et provoque même une tendance à la diminution de la O-GlcNAcylation de la desmine. Ce résultat, bien qu'étonnant, est en lien avec une étude publiée en 2015, qui montrait que 4 mutations simultanées

de Foxo1, cible de l'OGT, n'entraînaient pas une diminution mais bien une tendance à l'augmentation de la O-GlcNAcylation de ce facteur de transcription (*Fardini et al. 2015*). Notre résultat et cette étude suggèrent que la régulation de la O-GlcNAcylation des protéines est plus complexe qu'il n'y paraît.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'architecture des filaments intermédiaires de desmine. Nous avons démontré qu'un changement du taux global d'O-GlcNAcylation à la suite de nos deux traitements appliqués aux myotubes C2C12 modifie l'architecture des FI de desmine. En effet, lorsque la O-GlcNAcylation augmente avec un traitement au Thiamet G, ceux-ci sont plus diffus et moins marqués autour du noyau. De plus, un traitement par le Ac₄-5S-GlcNAc qui diminue le taux d'O-GlcNAcylation global semble augmenter l'épaisseur et la densité des filaments et modifie leur orientation puisqu'ils semblent moins parallèles que chez les contrôles.

Le phénomène de phosphorylation / déphosphorylation est au cœur de la modulation de la dynamique et des fonctions des FI (*Inagaki et al. 1988; Eriksson, Opal, et Goldman 1992; Sihag et al. 2007*). En effet, cette MPT module les propriétés intrinsèques des FI telles que leur organisation, leur turn-over, leur solubilité, leur interaction avec leurs protéines partenaires ainsi que leur redistribution au sein de compartiments soluble, insoluble ou cytosquelettique (*Omary et al. 2006*). Bien que la O-GlcNAcylation présente un lien fort avec la phosphorylation, nous avons démontré que le traitement au Ac₄-5S-GlcNAc n'induit pas de différence significative de la phosphorylation de la desmine comparé au contrôle. En revanche, nous avons montré une diminution significative de la deuxième forme phosphorylée (P2) de la desmine après un traitement au Thiamet G comparé au contrôle. Cela laisse suggérer que la O-GlcNAcylation pourrait moduler la phosphorylation de la desmine en agissant potentiellement sur certaines enzymes régulatrices. En effet, le processus de phosphorylation de la desmine est complexe puisqu'il fait intervenir de nombreuses kinases qui lient la desmine à de multiples mécanismes cellulaires (*Winter et al. 2014*). Alors que la phosphorylation *in vitro* de la desmine sur son domaine N-terminal conduit à la solubilisation des FI (*Inagaki et al. 1987*), une hyperphosphorylation est liée à la physiopathologie de pathologies du muscle squelettique telles que les myopathies myofibrillaires, ou du muscle cardiaque telle que l'insuffisance cardiaque. Ces pathologies sont caractérisées par une présence d'agrégation de la desmine (*Rappaport et al. 1988; Caron et Chapon 1999; Agnetti et al. 2014; Bouvet et al. 2016; Rainer et al. 2018; Bouvet et al. 2021*).

Alors qu'une diminution de la phosphorylation est corrélée à une diminution de la desmine intégrée au cytosquelette, nous avons analysé si cette protéine pouvait être différenciellement phosphorylée dans nos différentes fractions étudiées. Pour cela, nous avons utilisé la technique de Phostag-PAGE précédemment employée pour analyser la phosphorylation de la desmine dans le muscle cardiaque (*Agnetti et al. 2014; Bouvet et al. 2016; Mercier et al. 2018*) et qui permet d'obtenir le pattern de phosphorylation d'une protéine (*Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, et Koike 2009; Cieniewski-*

Bernard et al. 2014a). En revanche et à notre connaissance, c'est la première fois que cette approche était appliquée dans des cellules musculaires squelettiques en tenant compte de différentes fractions subcellulaires. Nous avons alors observé plusieurs signaux retardés correspondant aux formes phosphorylées de la desmine dans les fractions insoluble et cytosquelettique. En revanche, un très léger signal correspondant à une forme phosphorylée de la desmine a été détecté dans la fraction soluble, supportant que cette MPT impacterait la distribution cellulaire de la protéine et donc l'organisation et la réorganisation des FI. Ce résultat semble quelque peu surprenant car il était admis que la phosphorylation permettait au contraire le désassemblage des FI de desmine, ce que nous n'observons pas au cours de ces travaux de thèse. Il est important de préciser que des observations similaires avaient été faites pour la vimentine, une autre protéine de la famille des filaments intermédiaires de type III. En effet, contrairement aux autres kinases, la phosphorylation de la vimentine par MAPAKP kinase-2 semble n'avoir aucun effet sur son assemblage (*Cheng et al. 2003*).

Des études précédentes ont montré que la desmine était l'un des substrats de l'OGT (*Cieniewski-Bernard et al. 2012 ; Deracinois et al. 2018*) bien que le rôle de la MPT soit encore mal compris. De manière intéressante, la O-GlcNAcylation interviendrait dans la polymérisation de certaines protéines comme la tubuline (*Ji et al. 2011*) ou les cytokératines 8 et 18 (*Srikanth, Vaidya, et Kalraiya 2010*). De plus, la vimentine est également connue comme étant O-GlcNAcyliée (*Snider et Omary 2014*), en particulier sur son domaine N-terminal (*Zihao Wang, Pandey, et Hart 2007; Slawson et al. 2008; Tarbet et al. 2018*). La O-GlcNAcylation de cette protéine bloquerait son désassemblage (*Slawson et al. 2008*) et serait essentielle pour le maintien de sa morphologie et sa migration cellulaire (*Tarbet et al. 2018*). Ces données suggèrent que cette MPT pourrait également avoir un rôle à jouer sur la desmine. De plus, puisque l'unique site d'O-GlcNAcylation de la desmine sur sa sérine 460 est localisé dans son domaine C-terminal (*Deracinois et al. 2018*), la MPT pourrait donc exercer d'autres fonctions que celles attendues. En effet, la O-GlcNAcylation pourrait par exemple agir sur d'autres sites O-GlcNAcyliés de la protéine ou bien sur la régulation de kinases et phosphatases (*Dias, Cheung, et Hart 2012*) modulant la phosphorylation de la desmine.

Les FI de desmine sont des molécules de structure très importante pour le maintien de la structure du sarcomère. Outre les modifications post-traductionnelles, la desmine peut également exercer ses nombreuses fonctions par le biais d'une modulation de ses interactions avec de nombreuses protéines du cytosquelette sarcomérique.

II) La desmine comme garant de l'intégrité du muscle squelettique notamment via ses interactions protéiques : quel rôle des MPT ?

Nous savons que l'intégrité des filaments intermédiaires de desmine passe également par ses interactions protéine – protéine. En effet, cette protéine présente un interactome vaste et complexe avec de nombreux partenaires protéiques (*Hnia et al. 2015*), et parmi elles, son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline. Cette dernière joue un rôle très important pour les FI de desmine puisqu'elle assiste et module leur polymérisation tout en prévenant leur agrégation (*Nicholl et Quinlan 1994; Costa et al. 2004*).

Nos travaux ont démontré qu'une diminution du taux global d'O-GlcNAcylation consécutivement à un traitement au Ac₄-55-GlcNAc diminue l'interaction entre la desmine et son chaperon sans modifier le taux propre d'O-GlcNAcylation des deux protéines. Ce résultat peut paraître surprenant puisqu'il a récemment été démontré au laboratoire que le site d'O-GlcNAcylation de l' α B-cristalline sur la thréonine 162 est localisé dans le domaine C-terminal de la chaperonne (*Deracinois et al. 2018*), un des domaines d'interaction avec la desmine. Il est aujourd'hui largement admis que l' α B-cristalline est essentielle à la modulation de l'assemblage et la réorganisation des FI de desmine. Cependant, de nombreuses données suggèrent que selon les domaines d'interaction entre ces deux protéines, les effets peuvent être positifs ou au contraire négatifs vis-à-vis de ces mécanismes d'organisation et de réorganisation des FI (*Houck et al. 2011*). Dans ce sens, on sait qu'une modification de cette interaction est à l'origine de l'agrégation protéique de la desmine (*Houck et al. 2011*). L'agrégation des filaments intermédiaires étant caractéristique de certaines pathologies telles que les desminopathies qui sont caractérisées par une désorganisation du sarcomère et de la myofibrille toute entière. Par ailleurs, certains travaux ont montré que la O-GlcNAcylation de l' α B-cristalline jouait un rôle crucial dans la localisation et la stabilisation d'éléments du cytosquelette (*Krishnamoorthy, Donofrio, et Martin 2013*). Pourtant, nos données indiquent ici que la O-GlcNAcylation de l' α B-cristalline n'est pas modulée.

Cependant, un changement du taux global d'O-GlcNAcylation module la phosphorylation de la chaperonne. De plus, on sait que l' α B-cristalline possède jusqu'à 7 domaines d'interaction avec la desmine : le domaine C-terminal, mais également les feuilletts β 3 et β 8, ainsi que d'autres domaines peptidiques au niveau de l'extrémité N-terminale de l' α B-cristalline (*Ghosh, Shenoy, et Clark 2007*) (**figure 105**). Or, deux de ces domaines renferment également trois sites majeurs de phosphorylation : les sérines 19, 45 et 59. Alors que la sérine 45 de l' α B-cristalline est phosphorylée par la p44/42 MAP kinase, la sérine 59 est phosphorylée par la MAPKAP kinase-2 (*Bakthisaran et al. 2016*). Il a d'ailleurs été démontré que la p44/42 MAP kinase voit son activité augmentée lorsqu'elle est modifiée par la O-

GlcNAcylation (Kneass et Marchase 2005). Tout comme le changement du taux global d'O-GlcNAcylation altère la phosphorylation de la desmine, il modifie également celui de l' α B-cristalline, ce qui pourrait expliquer ce changement d'interaction entre les deux protéines. A ce titre, il a été démontré que l'augmentation de la phosphorylation de la sérine 59 augmente l'interaction entre l' α B-cristalline et les filaments d'actine lors d'un stress, permettant ainsi de prévenir leur agrégation (Launay et al. 2006; Ecroyd et al. 2007). Tandis que nous avons observé un changement de phosphorylation de l' α B-cristalline grâce à une approche sans *a priori* par le Phostag-PAGE, il sera indispensable de déterminer si le taux de phosphorylation de la petite protéine de choc thermique est modifié spécifiquement sur l'un ou l'autre des sites.

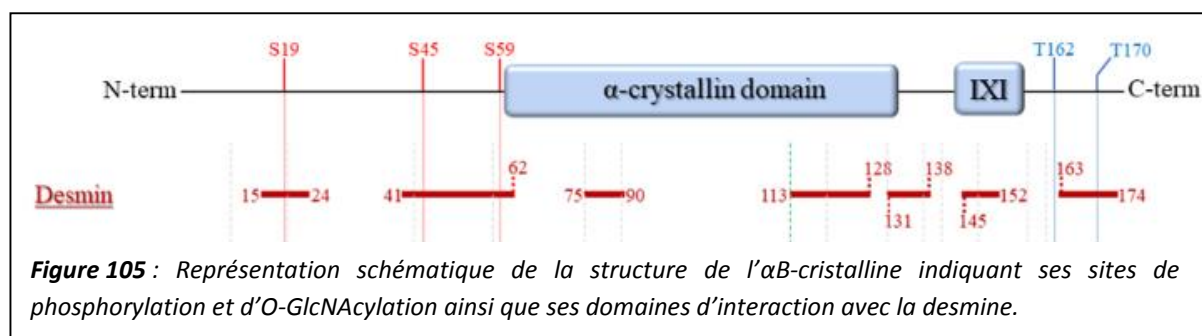


Figure 105 : Représentation schématique de la structure de l' α B-cristalline indiquant ses sites de phosphorylation et d'O-GlcNAcylation ainsi que ses domaines d'interaction avec la desmine.

L' α B-cristalline n'est pas la seule protéine ayant un impact sur les FI de desmine et l'architecture du cytosquelette. En effet, un changement de phosphorylation de la chaperonne HSP25 s'accompagne d'une relocalisation de la desmine à la strie Z, de sa colocalisation avec l' α -actinine, entraînant une désorganisation marquée de la strie Z (Kawano et al. 2012). De plus, il a été mis en évidence au laboratoire que les enzymes régulatrices de la O-GlcNAcylation, l'OGT et l'OGA sont localisées préférentiellement au contact de la strie Z (Cieniewski-Bernard et al. 2014a). C'est alors que de nombreuses protéines motrices, régulatrices et structurales du cytosquelette sarcomérique vont ainsi être O-GlcNAcylées (voir **figure 54**). Cela suggère que cette MPT pourrait intervenir dans la dynamique et les fonctions du sarcomère et dans une plus large mesure du muscle dans son intégralité. En effet, d'autres protéines liées directement ou indirectement aux filaments de desmine pourraient voir leur O-GlcNAcylation et leur phosphorylation modifiées lors d'une réorganisation du cytosquelette sarcomérique. Il serait alors intéressant de déterminer sans *a priori* s'il existe des changements de ces MPT sur d'autres protéines myofilaementaires consécutivement à un changement global d'O-GlcNAcylation. Une approche protéomique multiplexe mise en place au laboratoire il y a quelques années pourrait alors être utilisée dans le but de détecter l'O-GlcNAcome, le phosphoprotéome et le protéome total d'une condition sur un même gel bidimensionnel (Cieniewski-Bernard et al., 2014). Cette régulation par la O-GlcNAcylation serait en partie réalisée *via* des changements d'interactions protéine – protéine notamment de la desmine avec des partenaires (Lambert et al. 2016).

Nous avons donc voulu aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à cette régulation. Puisque la desmine est au cœur d'un vaste interactome, nous avons utilisé une stratégie protéomique sans *a priori* pour analyser les changements d'interaction de la desmine avec ses partenaires protéiques consécutivement à des changements du taux global d'O-GlcNAcylation. Basée sur une purification par affinité de l'interactome de la desmine, ensuite séparée par gel 2D, cette technique permet de comparer l'interactome d'une protéine selon plusieurs conditions expérimentales. Bien que les analyses ne sont pas encore totalement terminées, des résultats préliminaires laissent à penser que l'interaction entre la desmine et certains de ses partenaires pourrait être modifiée après un changement d'O-GlcNAcylation.

III) L'identification des sites d'O-GlcNAcylation de la desmine pour mieux comprendre son implication dans les mécanismes physiopathologiques

Certaines pathologies liées à la desmine sont caractérisées par une déstructuration du sarcomère conduisant à l'altération des fonctions du muscle (*Clemen et al. 2013*). De plus, des études montrent le lien qui existe entre la O-GlcNAcylation et l'apparition de certains troubles (*Nie et Yi 2019; Lee, Suh, et Kim 2021*). La O-GlcNAcylation ainsi que d'autres MPT pourraient donc être un lien entre la desmine et certaines pathologies musculaires (*Winter et al. 2014*).

Comme nous l'avons démontré, l'augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation conduit à une diminution de la phosphorylation de la desmine dans nos myotubes C2C12. La dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation a été mentionnée pour la première fois en 1987 (*Holt et al. 1987*). En effet, la O-GlcNAcylation semble impliquée dans la modulation du kinome et du phosphatome (*Dias et al., 2012; Schwein et Woo 2020; Ma, Hou, et Wu 2022*). De plus, ses enzymes régulatrices, OGT et OGA, interagissent avec des kinases et des phosphatases au sein de complexes multienzymatiques permettant la phosphorylation et/ou la O-GlcNAcylation des protéines (*Slawson et al. 2008 ; Cieniewski-Bernard et al. 2014*). Bien que des études se sont intéressées à cette dynamique chez de nombreuses protéines (*Hu, Shimoji, et Hart 2010; Zeidan et Hart 2010; Gerald W. Hart et al. 2011; van der Laarse, Leney, et Heck 2018*), elle reste cependant complexe et mal comprise, en particulier pour la desmine. En effet, la protéine est connue comme étant la cible de nombreuses kinases et phosphatase ; de plus, elle est également modifiée par les enzymes impliquées dans la O-GlcNAcylation : OGT et OGA qui peuvent elles-mêmes être O-GlcNAcylées et phosphorylées (**figure 106**) (*Nagel et Ball 2014*). De manière intéressante, nous avons montré que la O-GlcNAcylation et la phosphorylation étaient mutuellement exclusives pour la desmine puisque lorsqu'elle est O-

GlcNAcylée, elle n'est pas phosphorylée. Afin d'essayer d'établir un lien entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la desmine, nous nous sommes intéressés à ses kinases et ses phosphatases consécutivement à un changement d'O-GlcNAcylation. En effet, la diminution de phosphorylation d'une protéine peut provenir d'une diminution de l'activité de kinase(s) et/ou de d'une augmentation de l'activité de phosphatase(s).

A l'aide d'une stratégie sans *a priori* de l'étude de l'activité de phosphatases (Kameshita *et al.* 2010), nous n'avons pas observé et quantifié de changement. Puisque la desmine est connue comme étant phosphorylée par de nombreuses kinases, nous avons en parallèle, sélectionné les kinases majeures de la protéine à savoir PKA, PKC, PAK et CamKII (pour revue, (Winter *et al.* 2014)). Il est important de souligner que chacune de ces kinases est elle-même décrite comme étant O-GlcNAcylée et phosphorylée. Ainsi, il a été démontré que la sous-unité catalytique de la PKA pouvait être modifiée par la O-GlcNAcylation, ce qui modifiait son activité et sa localisation cellulaire (Xie *et al.* 2016). La PKC existe sous différentes isoformes, toutes connues comme étant modifiées par la O-GlcNAcylation de manière dynamique avec la phosphorylation, sur un même site ou sur des sites adjacents. A titre d'exemple, la PKC α peut être relocalisé et voir son activité être négativement régulée par la O-GlcNAcylation (Robles-Flores *et al.* 2008). Enfin, la CamKII peut être activée par la O-GlcNAcylation sur un site d'activation (Erickson 2014). Grâce à l'étude de leur activité ou de leur statut d'activation, nous avons démontré une augmentation de l'activité de PKA conjointement à une diminution d'O-GlcNAcylation par le traitement au Ac₄-5S-GlcNAc sans que la phosphorylation de la desmine soit modifiée. A l'opposé, un traitement des myotubes par le Thiamet G provoque une diminution du statut d'activation de CamKII. Malgré la complexité de ces mécanismes, nous avons démontré que cette diminution d'une des formes phosphorylées de la desmine était associée à l'augmentation de la O-GlcNAcylation à l'origine d'une diminution de l'activité de CamKII.

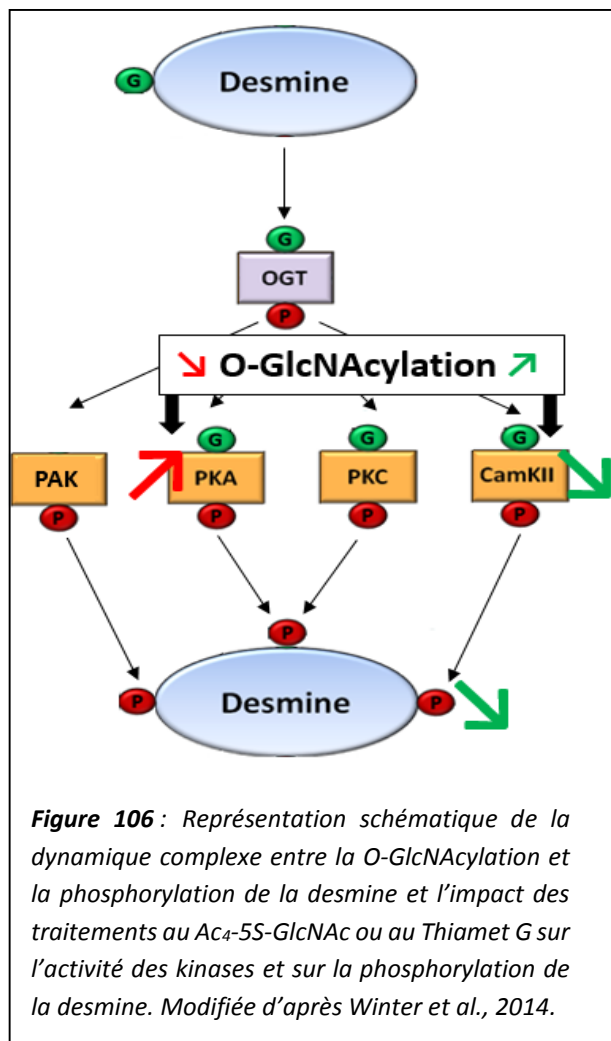


Figure 106 : Représentation schématique de la dynamique complexe entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation de la desmine et l'impact des traitements au Ac₄-5S-GlcNAc ou au Thiamet G sur l'activité des kinases et sur la phosphorylation de la desmine. Modifiée d'après Winter *et al.*, 2014.

À titre d'exemple, la PKC α peut être relocalisé et voir son activité être négativement régulée par la O-GlcNAcylation (Robles-Flores *et al.* 2008). Enfin, la CamKII peut être activée par la O-GlcNAcylation sur un site d'activation (Erickson 2014). Grâce à l'étude de leur activité ou de leur statut d'activation, nous avons démontré une augmentation de l'activité de PKA conjointement à une diminution d'O-GlcNAcylation par le traitement au Ac₄-5S-GlcNAc sans que la phosphorylation de la desmine soit modifiée. A l'opposé, un traitement des myotubes par le Thiamet G provoque une diminution du statut d'activation de CamKII. Malgré la complexité de ces mécanismes, nous avons démontré que cette diminution d'une des formes phosphorylées de la desmine était associée à l'augmentation de la O-GlcNAcylation à l'origine d'une diminution de l'activité de CamKII.

Afin de valider cela, nous avons mis en place deux nouveaux traitements par la caféine et un co-traitement par la caféine associée au KN-93 qui nous ont permis d'augmenter et diminuer respectivement l'activité de CamKII. Alors qu'une activation de CamKII ne modifie pas la phosphorylation de la desmine, il s'avère qu'une diminution de l'activité de la kinase par le co-traitement, provoque une diminution de la même forme phosphorylée de la desmine que celle lors d'une augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation pourrait donc réguler la kinase, et ce, de manière indépendante du calcium. Malheureusement, aucun lien n'a pu être établi entre l'augmentation globale d'O-GlcNAcylation et celle de CamKII puisque le niveau de cette MPT reste inchangé sur la kinase lors du traitement au Thiamet G. Cette régulation pourrait alors potentiellement se faire *via* des changements d'interaction avec ses protéines partenaires comme il a été démontré dans la littérature (*Jalan-Sakrikar et al. 2012*) et rendre le mécanisme encore plus complexe.

Pour aller plus loin dans la compréhension de la dynamique entre les différentes MPT, nous sommes également intéressés à l'ubiquitination. Cette dernière joue un rôle majeur dans le système de dégradation ubiquitine-protéasome permettant de dégrader les protéines mal conformées ou présentes au sein d'agrégats délétères pour la cellule. C'est le cas de la desmine lors de desminopathies, myopathies myofibrillaires rares. Tandis que le taux global d'ubiquitination est modifié consécutivement aux changements du taux global d'O-GlcNAcylation induits par nos traitements, il reste inchangé pour nos deux protéines d'intérêt. Par son importance dans les mécanismes physiopathologiques et puisque qu'il existe une dynamique phosphorylation / O-GlcNAcylation / ubiquitinylation (*Guinez et al. 2008; Ruan, Nie, et Yang 2013*), l'analyse de cette MPT n'est pas à délaissier en particulier en condition de stress cellulaire où la présence d'agrégats protéiques est importante.

Ces différentes données suggèrent que l'état et les propriétés de la desmine pourraient résulter d'un mécanisme complexe entre ces différentes MPT. En effet, nous avons montré qu'un changement du taux global d'O-GlcNAcylation mène à une diminution d'une forme phosphorylée de la desmine mais nous ne savons pas quels sites sont impliqués dans ce changement. Une étude précédemment menée au laboratoire avait conduit à l'identification d'un site d'O-GlcNAcylation sur la sérine 460 dans le domaine C-terminal de la desmine (*Deracinois et al. 2018*). Ce domaine étant impliqué dans l'assemblage, la stabilisation et l'élongation des FI de desmine (*Heimburg et al. 1996; Harald Herrmann et Aebi 2016*) ainsi que dans les interactions de la desmine avec ses protéines partenaires du cytosquelette (*Rogers et al. 1995*), il est donc très important pour l'intégrité du muscle squelettique. C'est pourquoi des mutations présentes au niveau de ce domaine C-terminal conduisent à l'apparition d'agrégats protéiques, de faiblesse et d'atrophie musculaires caractéristiques des

desminopathies (Bär *et al.* 2007; Segard *et al.* 2013). En revanche, ces études ne mentionnent pas de désorganisation des myofibrilles et du sarcomère. Concernant l' α B-cristalline, il avait été démontré qu'elle présentait un seul site d'O-GlcNAcylation sur sa thréonine 162 (Deracinois *et al.* 2018) dans un domaine impliqué dans de nombreuses interactions protéine – protéine dont la desmine (Houck *et al.* 2011). Ces données suggèrent que les MPT pourraient jouer un rôle important dans la modulation de l'interaction entre la desmine et l' α B-cristalline. Cependant, les mécanismes sont encore peu clairs et nécessitent d'être investigués.

Enfin, et de manière surprenante, l'analyse des patterns d'O-GlcNAcylation de la desmine et de l' α B-cristalline par WGA-PAGE ont montré d'une part que la O-GlcNAcylation semblerait impliquée dans la distribution cellulaire des protéines puisque les profils d'O-GlcNAcylation sont différents d'une fraction à l'autre. D'autre part, ces patterns présentent différentes bandes retardées correspondant potentiellement à plusieurs sites d'O-GlcNAcylation sur les deux protéines alors qu'un seul site sur chaque protéine a été identifié jusqu'à présent. Il serait alors intéressant de réaliser une nouvelle analyse plus ciblée pour identifier le ou les sites d'O-GlcNAcylation touchés par cette diminution de phosphorylation qui implique CamKII. Et dans une plus large mesure l'ensemble des sites d'O-GlcNAcylation de la desmine et de l' α B-cristalline afin de mieux comprendre le rôle et les mécanismes moléculaires de cette MPT dans le muscle squelettique.

IV) Conclusion

L'ensemble de ces données suggèrent donc que le mécanisme d'O-GlcNAcylation contribue à la modification de l'interaction et de la partition de la desmine et l' α B-cristalline, ainsi que de leur niveau d'expression protéique (**figure 104**).

Ainsi, lorsque le taux d'O-GlcNAcylation diminue à la suite d'un traitement au Ac₄-5S-GlcNAc, nous avons montré une augmentation du niveau protéique de la desmine, qui sera préférentiellement retrouvée dans la fraction insoluble tandis que son interaction avec l' α B-cristalline diminue. Ce résultat est corrélé à la présence de la petite HSP dans la fraction insoluble. Nous n'avons noté aucun changement de localisation de la desmine au cytosquelette, bien que l'organisation des filaments intermédiaires de desmine soit perturbée. De plus, la O-GlcNAcylation et la phosphorylation de la desmine ne sont pas modifiées. Or, la phosphorylation de la desmine est impliquée dans l'organisation des filaments intermédiaires de desmine (Inagaki *et al.* 1988; X. Huang *et al.* 2002; Sihag *et al.* 2007). L'ensemble de ces données suggèrent donc que la desmine, dont le niveau protéique est augmenté mais pas son taux de phosphorylation, n'est pas intégrée au cytosquelette, mais sera retrouvée dans la fraction protéique insoluble.

En revanche, le Thiamet G semble moduler la O-GlcNAcylation de la desmine, mais surtout conduit à une diminution de sa phosphorylation *via* une diminution de l'activité de CamKII, entraînant ainsi une diminution de son intégration au cytosquelette. Ces données semblent corrélées avec l'organisation des filaments intermédiaires de desmine, puisque nous avons observé que les filaments de desmine étaient très diffus et moins bien organisés après le traitement au Thiamet G. L'augmentation du taux global d'O-GlcNAcylation conduit également à une légère diminution de l'expression de l' α B-cristalline mais n'a pas d'effet sur son interaction avec la desmine.

Nos données supportent le fait que la localisation subcellulaire de la desmine pourrait être finement régulée de manière spatio-temporelle par sa signature en MPT en particulier la O-GlcNAcylation. Il est donc essentiel de clarifier cette dynamique des MPT afin de comprendre la régulation de ces mécanismes en particulier dans un contexte de pathologie des muscles striés.

PERSPECTIVES

Ces travaux ont permis d'éclaircir le rôle de la O-GlcNAcylation sur les propriétés de la desmine dans notre modèle de myoblastes murins différenciés en myotubes. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'analyser d'autres paramètres en relation avec les MPT, la desmine et dans une plus large mesure le muscle squelettique dans son ensemble.

I) Finalisation de l'étude de l'interactome de la desmine

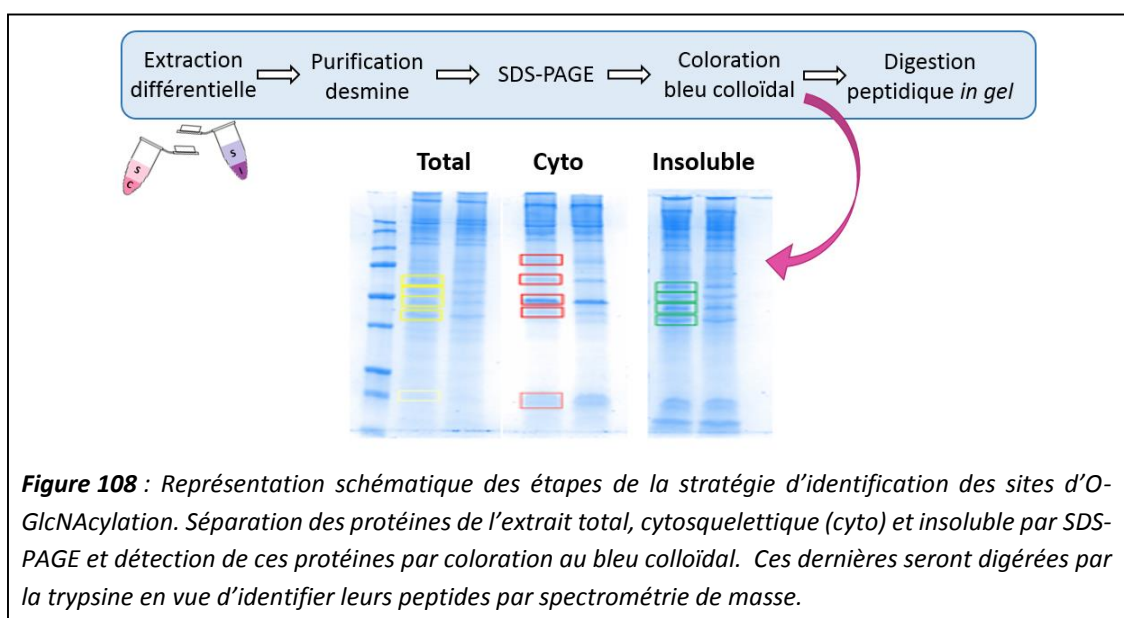
Comme énoncé dans les résultats et la discussion, nous avons initié une stratégie protéomique sans *a priori* pour analyser l'interactome de la desmine consécutivement aux changements du taux global d'O-GlcNAcylation. Pour rappel, cette approche repose sur une purification de la protéine d'intérêt par co-immunoprécipitation, ici la desmine, associée à ses partenaires protéiques. Ceux-ci, sont ensuite séparés par électrophorèse bidimensionnelle, après détection des protéines, les signaux obtenus sont analysés à l'aide du logiciel SameSpot. Les premières données laissent à penser que l'interaction de la desmine avec certaines protéines pourrait être modifiée lors d'un changement global d'O-GlcNAcylation. Lorsque l'ensemble des gels aura été analysé par le logiciel, les spots différentiels seront excisés du gel et soumis à une digestion protéolytique. L'analyse par spectrométrie de masse des peptides permettra l'identification des protéines différentielles constitutives de l'interactome de la desmine. Ces résultats seront ensuite validés par différentes approches expérimentales telles que la co-immunoprécipitation, le western-blot, la PLA (proximity ligation assay) permettant de visualiser par immunofluorescence le degré d'interaction entre deux partenaires protéiques (Arias-Calderón *et al.* 2016; Alam 2018).

II) Modulation de la phosphorylation et impact sur la O-GlcNAcylation

Afin de compléter les données obtenues dans le cadre de ma thèse, nous pourrions comme pour la O-GlcNAcylation avec le Ac₄-5S-GlcNAc et le Thiamet G, faire varier le taux global de phosphorylation à l'aide de molécules pharmacologiques. Parmi elles, nous pourrions utiliser le 12-O-tétradécanylphobol-13-acétate (TPA), un activateur de la PKC ou le 8-Br-cAMP, un activateur de la PKA. Pour rappel, ces enzymes sont connues comme phosphorylant la desmine (Huang *et al.* 2002; Winter *et al.* 2014). C'est dans ce sens que des données antérieures du laboratoire ont montré qu'une activation de PKC par le TPA conduisait à des changements d'O-GlcNAcylation de la desmine ainsi qu'une modulation de son interaction avec son chaperon moléculaire l' α B-cristalline (données non publiées). Il pourrait également être envisagé d'utiliser des modulateurs de l'activité de p44/42 MAP

les extractions différentielles (soluble, insoluble, cytosquelette), les patterns d'O-GlcNAcylation de la desmine et de l' α B-cristalline semblent bien plus complexes que la présence d'un unique site. Cela suggère que la O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle dans la distribution cellulaire de ces protéines.

Afin de mieux comprendre comment la O-GlcNAcylation pourrait agir sur la partition de la desmine et de l' α B-cristalline, nous pourrions déterminer quels sont ses autres sites cibles. Pour cela, après les différentes extractions protéiques, les protéines seraient purifiées en vue de l'identification des sites. Des expériences préliminaires de purification de la desmine ont été réalisées par immunoprécipitation mais également selon trois protocoles (*Geisler et Weber 1980; Baron et al., 2004; Chen et al. 2014*) mais nécessitent d'être optimisées. Lorsque la purification sera la plus efficace possible, les échantillons correspondant aux différentes fractions seront séparés par SDS-PAGE, le gel sera coloré au bleu colloïdal et les bandes correspondantes à nos protéines seront découpées puis digérées en vue de l'analyse peptidique par spectrométrie de masse (**Figure 108**).



B) La mutation des sites O-GlcNAcylés pour mieux comprendre les répercussions de la O-GlcNAcylation sur les fonctions des protéines d'intérêt

Dès lors que ces nouveaux sites seront identifiés, il serait envisageable de réaliser une mutagenèse dirigée pour muter tout ou partie de ces sites. Les résidus sérine et/ou thréonine O-GlcNAcylés seraient remplacés par un acide aminé non O-GlcNAcylable tel que l'alanine. L'analyse des protéines mutées ainsi formées permettrait de mieux comprendre les répercussions de cette MPT sur la mise en place du réseau de desmine et sur les fonctions cellulaires impliquant la desmine telles que l'activité mitochondriale, la protéolyse, la transmission de la force (*Paulin et al. 2004; Hnia et al. 2015; L. Winter et al. 2019*). Pour rappel, nous savons que le site d'O-GlcNAcylation connu de la desmine sur sa sérine

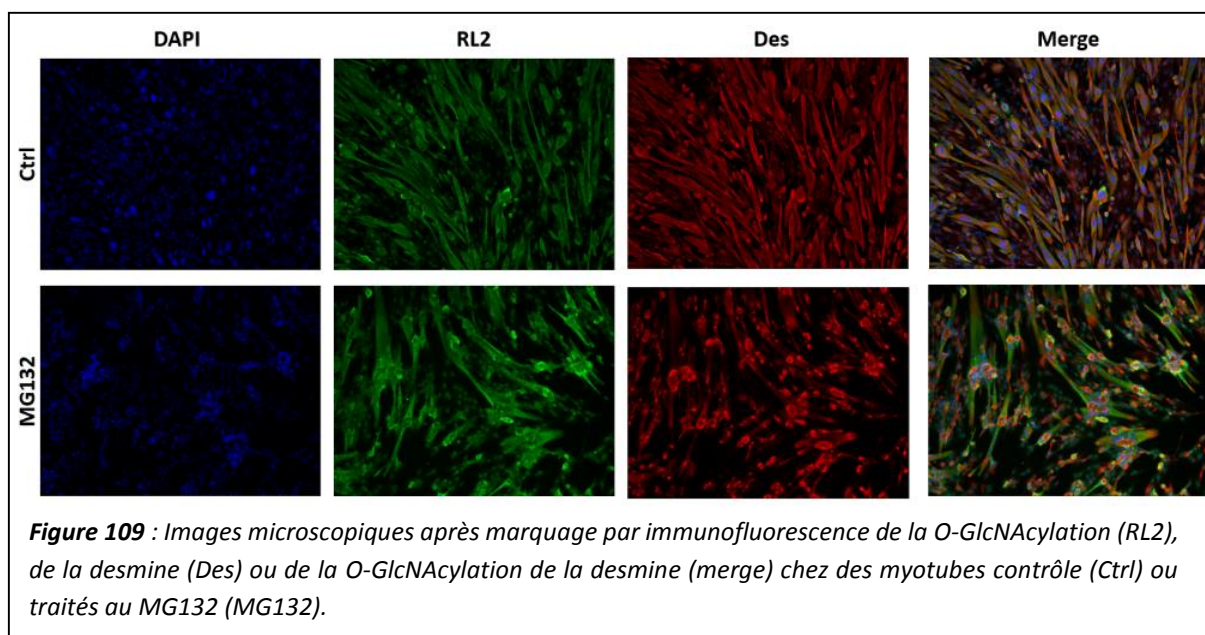
460 est muté dans le cadre des desminopathies (*Yassemi Capetanaki et al. 2015*) et qu'une mutation de ce site dans les cellules C2C12 conduit à la formation d'agrégats protéiques caractéristiques de ces pathologies (*Segard et al. 2013*). Enfin, une mutagénèse dirigée permettrait également de connaître l'impact de la O-GlcNAcylation sur les interactions de la desmine avec ses partenaires protéiques, notamment l' α B-cristalline.

IV) Analyser les propriétés de la desmine en conditions de stress

Des études ont montré que des conditions de stress protéotoxiques conduisaient à des changements de MPT de protéines chaperonnes telle que l' α B-cristalline. De plus, cet environnement particulier provoquait également des changements d'interactions avec leurs partenaires protéiques (*Krishnamoorthy, Donofrio, et Martin 2013*). L'ensemble de ces modifications conduisent généralement à des altérations des fonctions de ces protéines chaperonnes (*Collier et Benesch 2020; Höhfeld et al. 2021*). De plus, des données préliminaires du laboratoire ont montré que lors d'un stress protéotoxique induit par le MG132, un inhibiteur du protéasome, la forme des cellules musculaires, la localisation et les MPT de l' α B-cristalline étaient modulés. En revanche, aucune étude ne s'est intéressée aux propriétés de la desmine en condition de stress, notamment ses MPT.

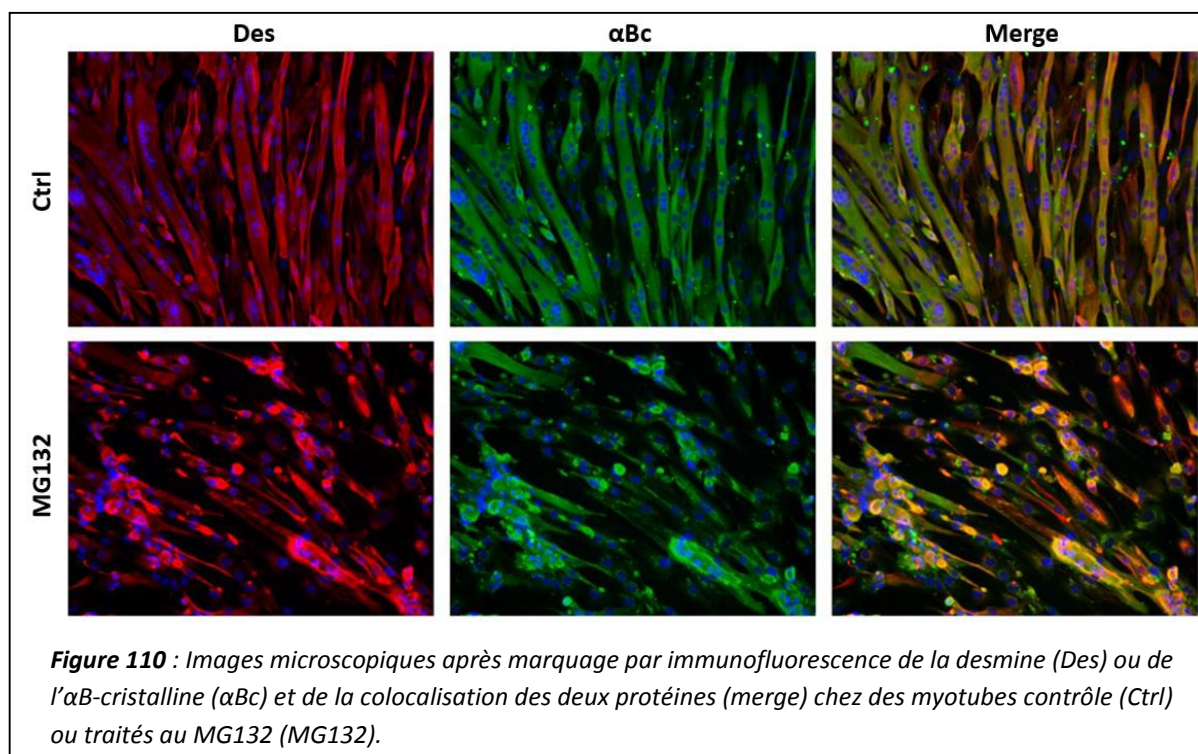
A) Analyse des MPT de la desmine

Comme nous l'avons fait lors de ces travaux de thèse avec le Thiamet G et le Ac₄-5S-GlcNAc, nous pourrions analyser le niveau protéique et la distribution cellulaire de la desmine en condition de stress. De plus, les MPT de la desmine à savoir la O-GlcNAcylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (*Ruan, Nie, et Yang 2013*) seraient également analysées consécutivement à un traitement des cellules par le MG132. Une première expérience a été réalisée afin de comprendre comment ce stress peut influencer la distribution cellulaire de la desmine, la O-GlcNAcylation globale mais également celle de la protéine. Dans un premier temps, on remarque que le stress induit par le MG132 impacte fortement la localisation de la desmine qui n'est plus sous forme de FI homogènes au sein de la cellule mais plutôt sous forme d'agrégats protéiques (**figure 109**). Concernant la O-GlcNAcylation, la **figure 109** montre que le niveau global de cette MPT ne semble pas impacté par le MG132 ; en revanche, la desmine semble beaucoup moins O-GlcNAcylée en condition de stress (**figure 109**) qu'elle ne l'était chez les myotubes contrôles.



B) Analyse de l'interaction avec l' α B-cristalline

L'expérience précédente ainsi que des données préliminaires du laboratoire montrent qu'un stress induit par le MG132 semble modifier la O-GlcNAcylation de la desmine et modifie les MPT de l' α B-cristalline. Or, les sites d'O-GlcNAcylation et de phosphorylation de la chaperonne sont dans ou à proximité de domaines d'interaction avec la desmine (**figure 105**) suggérant que les MPT pourraient agir sur l'interaction entre les deux protéines. La **figure 110** montre que cette interaction est grandement perturbée lorsque les cellules sont en condition de stress provoquée par le MG132. Il serait alors intéressant d'étudier cette interaction en condition de stress et en présence de desmine et/ou d' α B-cristalline mutées au niveau de leur site de phosphorylation et/ou d'O-GlcNAcylation. Nous pourrions également analyser l'interaction entre nos deux protéines d'intérêt par le biais d'autres techniques telle que la résonance plasmonique de surface (*Douzi 2017*). Cette méthode optique permet de mesurer la fixation d'un ligand sur son récepteur fixé à une surface métallique et ainsi détecter les interactions protéine – protéine.



V) Analyser les répercussions fonctionnelles des MPT

De nombreuses études s'intéressent à l'impact des MPT sur les processus cellulaires mais très peu d'entre elles ont étudié leurs répercussions fonctionnelles au niveau du muscle squelettique. De plus, des études suggèrent que la O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle dans la contraction des muscles striés (Ramirez-Correa et al. 2008; C. Cieniewski-Bernard et al. 2009) sans que les mécanismes sous-jacents soient clairement définis.

Pour pallier ce problème, une stratégie d'injection intramusculaire de siARN dans les muscles de rats adultes mâles Wistar a été envisagée au laboratoire dans le but de mettre sous silence l'expression des enzymes régulatrices de la O-GlcNAcylation. Des tests ont été réalisés afin de s'assurer de l'efficacité de l'injection des siARN puisque c'est la première fois que cette méthode était utilisée au laboratoire. Dans un premier temps, il a fallu valider la technique d'injection. Pour cela, nous avons injecté du DAPI vital au sein du gastrocnémien de rat. Comme le montre la **figure 111**, ce DAPI était réparti de manière homogène indiquant que l'injection permettait une diffusion correcte pour l'ensemble du muscle.

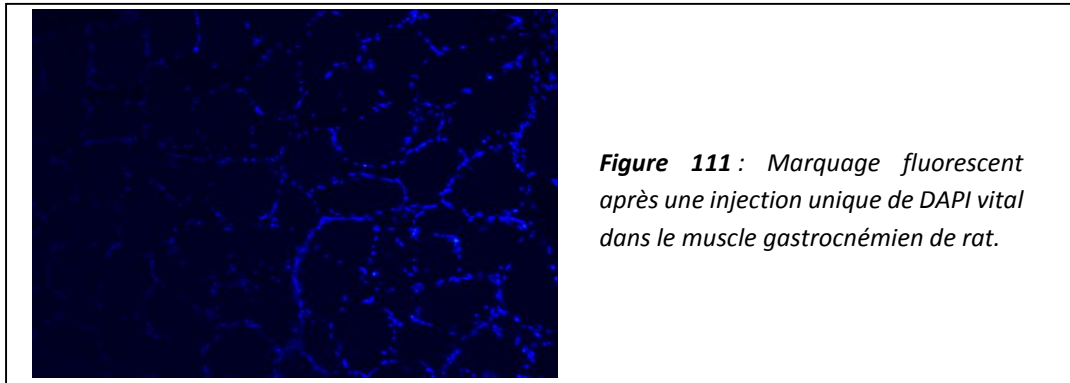


Figure 111 : Marquage fluorescent après une injection unique de DAPI vital dans le muscle gastrocnémien de rat.

Ensuite, nous avons voulu analyser l'impact de ces siARN sur l'activité spécifique, l'expression transcriptionnelle et protéique des enzymes ainsi que sur le taux global d'O-GlcNAcylation. Puisque l'injection de siOGT ne donnait pas de résultats significatifs et reproductibles (données non présentées), nous nous sommes focalisés sur les répercussions d'une injection de siOGA. Initialement nous utilisons un « smart pool » composé de quatre siOGA différents puis nous avons initié des tests avec les différents siOGA. La **figure 112** montre que le siOGA#3 semble le plus efficace puisqu'il permet de diminuer significativement l'activité spécifique de l'enzyme (**figure 112A**) ainsi que son expression transcriptionnelle (**figure 112B**). En revanche, ce siARN ne permet pas de modifier le taux global d'O-GlcNAcylation (**figure 112C**) et augmente de manière surprenante le niveau protéique d'OGA (**figure 112D**).

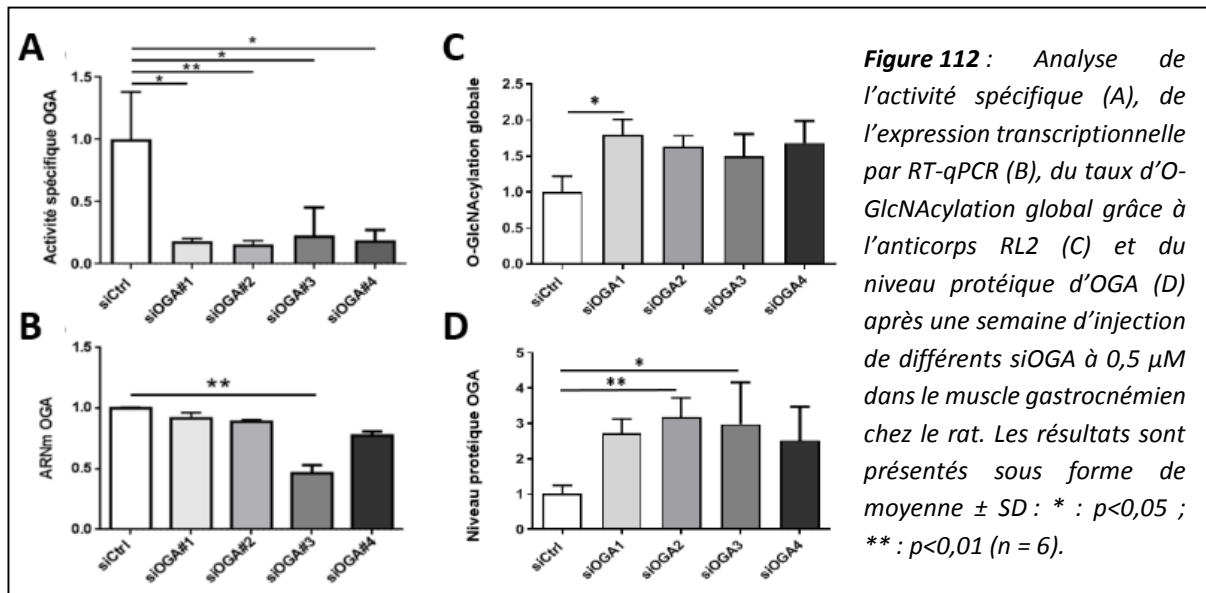


Figure 112 : Analyse de l'activité spécifique (A), de l'expression transcriptionnelle par RT-qPCR (B), du taux d'O-GlcNAcylation globale grâce à l'anticorps RL2 (C) et du niveau protéique d'OGA (D) après une semaine d'injection de différents siOGA à 0,5 μ M dans le muscle gastrocnémien chez le rat. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ (n = 6).

Ces données préliminaires montrent que les siARN permettent d'effectuer certains changements intéressants. Cependant, face aux résultats trop peu reproductibles, ces expérimentations restent à optimiser. Dès lors, les répercussions de la O-GlcNAcylation seront investiguées sur la locomotion. Les traces de pas, la démarche et la répartition du poids corporel chez des animaux en mouvement non forcé seront analysées par la technique du Catwalk. De plus, certains paramètres de la fonction

contractile seront déterminés tels que l'endurance, la fatigue, les forces isométrique, active et post-tétanique. Ensuite, les muscles pourront subir des analyses histologiques afin de définir la morphologie globale et le phénotype musculaire mais également la morphométrie du sarcomère et la localisation subcellulaire des mitochondries. Enfin, afin de corrélérer les éventuels changements fonctionnels et structuraux aux MPT, une analyse protéomique sans *a priori* pourrait être menée en analysant la dynamique phosphorylation / O-GlcNAcylation.

Ces analyses protéomiques, de la fonction contractile et dans une plus large mesure de la tâche motrice et de la locomotion pourraient permettre de déchiffrer le rôle de la O-GlcNAcylation dans la fonction du muscle squelettique ; mais également de déterminer quel changement de MPT pourrait améliorer cette fonction.

VI) Analyse des MPT dans des modèles pathologiques

Outre leur impact sur la fonctionnalité du muscle squelettique, des études supportent le fait que les MPT seraient impliquées dans certaines pathologies musculaires. En effet, il a démontré qu'un changement de phosphorylation de la troponine T pouvait être utilisé comme marqueur de l'insuffisance cardiaque (*Dubois et al. 2011*). De plus, les MPT de la desmine interviendraient dans l'apparition de myopathies myofibrillaires particulières, les desminopathies (*D. L. Winter et al. 2014*). En revanche, les mécanismes physiopathologiques de ces MPT, en particulier la O-GlcNAcylation et la phosphorylation sont encore mal compris. C'est pourquoi, la dernière stratégie envisagée serait d'étudier ces MPT dans le cadre de modèles pathologiques du muscle squelettique, plus particulièrement différents modèles de desminopathies pourraient être envisagés. Ces études permettraient d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou bien d'utiliser des changements de ces MPT comme potentiels marqueurs à ces pathologies.

Sur l'ensemble de ces modèles, nous pourrions réaliser des analyses du taux global d'O-GlcNAcylation et/ou de phosphorylation, du niveau protéique ainsi que de la localisation des enzymes régulatrices de ces MPT : OGT, OGA, kinases et phosphatases. Nous pourrions également nous focaliser sur l'analyse de nos deux protéines d'intérêt, la desmine et l' α B-cristalline et sur leur interaction dans ces modèles.

A) Modèles cellulaires

Dans un premier temps, il pourrait s'agir de modèles cellulaires qui miment la pathologie. En effet, certaines mutations de la desmine induisent un phénotype cellulaire se rapprochant de celui observé lors des desminopathies avec présence d'agrégats protéiques, désorganisation des myofibrilles et délocalisation des organites tels que les noyaux et les mitochondries (*Yassemi Capetanaki et al. 2015*). C'est le cas des mutations S46Y, Q389P, D399Y, R406W, S460I décrites par l'équipe de Sabrina Batonnet-Pichon et collaborateurs dans un modèle de cellules musculaires squelettiques (*Segard et al. 2013; Delort et al. 2019*). De plus, puisqu'une mutation de l' α B-cristalline semble impliquée dans l'apparition d'agrégats protéiques de desmine (*Vicart et al. 1998; M. D. Perng et al. 2004*), nous pourrions également considérer les modèles cellulaires de mutations de la chaperonne comme de bons candidats pour analyser les MPT.

B) Modèles animaux

Outre les modèles cellulaires et afin de se rapprocher encore plus de la physiopathologie et du phénotype des desminopathies humaines, nous pourrions utiliser des modèles animaux. Parmi ces modèles animaux de desminopathies, il existe deux modèles murins que nous pourrions envisager. Le premier provient d'un knock-in chez la souris entraînant la mutation R349P de la desmine, celle-ci étant l'orthologue de la mutation faux-sens R350P la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme. Cette mutation provoque un déséquilibre de l'homéostasie protéique musculaire qui conduit à un dysfonctionnement du cytosquelette sarcomérique et de l'appareil myofibrillaire (*L. Winter et al. 2019*) associé à une faiblesse musculaire progressive (*Diermeier et al. 2017*). Le second modèle animal que nous pourrions utiliser fait également référence à la mutation R350P chez l'Homme et est induite chez le rat R349P *via* la technique de Crispr-Cas9. Bien que ce modèle ne présente pas de différences macroscopiques, il conduit à des troubles moléculaires tels que des changements de niveaux protéiques de certaines protéines de structure du muscle et de la taille des fibres (*Langer et al. 2020*).

Bien que les modèles animaux tentent de se rapprocher de plus en plus de ce qui arrive chez l'Homme en matière de génétique, de structure et de fonctionnalité de ces pathologies (*Schröder, Vrabie, et Goebel 2007; Clemen et al. 2015*), les échantillons provenant de patients restent les plus pertinents. Pour aller encore plus loin dans la compréhension de l'implication des MPT dans les desminopathies humaines, nous pourrions alors envisager de réaliser des analyses sur des coupes ou des biopsies de muscles de patients atteints de ces pathologies.

L'ensemble des données présentées dans ce manuscrit indiquent que les MPT, en particulier la O-GlcNAcylation et la phosphorylation, seraient des modulateurs importants de la structure et de la fonction du muscle squelettique. En revanche, leur dynamique qui est très complexe étant donné le nombre de sites modifiés nécessite d'être étudiée de manière plus approfondie. La compréhension de ces mécanismes de régulation pourrait alors apporter de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre la physiopathologie de certaines maladies musculaires, telles que l'atrophie musculaire ou les desminopathies. Dans une plus large mesure, cela pourrait s'appliquer à toutes les myopathies myofibrillaires ou bien même à l'ensemble des pathologies présentant une protéotoxicité.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdul-Ghani, Muhammad A., et Ralph A. DeFronzo. 2010. « Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010: 476279. <https://doi.org/10.1155/2010/476279>.
- Agbulut, O., Z. Li, S. Périé, M. A. Ludosky, D. Paulin, J. Cartaud, et G. Butler-Browne. 2001. « Lack of Desmin Results in Abortive Muscle Regeneration and Modifications in Synaptic Structure ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49 (2): 51-66. <https://doi.org/10.1002/cm.1020>.
- Agnetti, Giulio, Victoria L. Halperin, Jonathan A. Kirk, Khalid Chakir, Yurong Guo, Linda Lund, Francesco Nicolini, et al. 2014. « Desmin Modifications Associate with Amyloid-like Oligomers Deposition in Heart Failure ». *Cardiovascular Research* 102 (1): 24-34. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu003>.
- Agnetti, Giulio, Harald Herrmann, et Shenhav Cohen. 2022. « New Roles for Desmin in the Maintenance of Muscle Homeostasis ». *The FEBS Journal* 289 (10): 2755-70. <https://doi.org/10.1111/febs.15864>.
- Ahmad, Ishtiaq, Daniel C. Hoessli, Evelyne Walker-Nasir, M. Iqbal Choudhary, Saleem M. Rafik, Abdul Rauf Shakoori, et Nasir-ud-Din. 2006. « Phosphorylation and Glycosylation Interplay: Protein Modifications at Hydroxy Amino Acids and Prediction of Signaling Functions of the Human Beta3 Integrin Family ». *Journal of Cellular Biochemistry* 99 (3): 706-18. <https://doi.org/10.1002/jcb.20814>.
- Ahmed, Mustafa I., Jason L. Guichard, Rajasekaran Namakkal Soorappan, Shama Ahmad, Nithya Mariappan, Silvio Litovsky, Himanshu Gupta, et al. 2016. « Disruption of Desmin-Mitochondrial Architecture in Patients with Regurgitant Mitral Valves and Preserved Ventricular Function ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 152 (4): 1059-1070.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.06.017>.
- Ahmed, Oumaima, Malik Affar, Louis Masclef, Mohamed Echbicheb, Mila Gushul-Leclaire, Benjamin Estavoyer, David J. Vocadlo, et El Bachir Affar. 2022. « Immunoprecipitation and Western Blot-Based Detection of Protein O-GlcNAcylation in Cells ». *STAR Protocols* 3 (1): 101108. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101108>.
- Akimoto, Yoshihiro, Kunimasa Yan, Yuri Miura, Hiroki Tsumoto, Tosifusa Toda, Toshiyuki Fukutomi, Daisuke Sugahara, et al. 2019. « O-GlcNAcylation and Phosphorylation of β -Actin Ser199 in Diabetic Nephropathy ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 317 (5): F1359-74. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00566.2018>.
- Alam, Muhammad S. 2018. « Proximity Ligation Assay (PLA) ». *Current Protocols in Immunology* 123 (1): e58. <https://doi.org/10.1002/cpim.58>.
- Allan, Rudi Kenneth, et Thomas Ratajczak. 2011. « Versatile TPR Domains Accommodate Different Modes of Target Protein Recognition and Function ». *Cell Stress & Chaperones* 16 (4): 353-67. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0248-0>.
- Alonso, Jana, Marianne Schimpl, et Daan M. F. van Aalten. 2014. « O-GlcNAcase: Promiscuous Hexosaminidase or Key Regulator of O-GlcNAc Signaling? ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34433-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609198>.
- Alteen, Matthew G., Hong Yee Tan, et David J. Vocadlo. 2021. « Monitoring and Modulating O-GlcNAcylation: Assays and Inhibitors of O-GlcNAc Processing Enzymes ». *Current Opinion in Structural Biology* 68 (juin): 157-65. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.12.008>.
- Anbarasu, Kumarasamy, et Jeyarajan Sivakumar. 2016. « Multidimensional Significance of Crystallin Protein-Protein Interactions and Their Implications in Various Human Diseases ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (1 Pt B): 222-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.005>.
- Andley, Usha P., Paul D. Hamilton, Nathan Ravi, et Conrad C. Weihl. 2011. « A Knock-in Mouse Model for the R120G Mutation of AB-Crystallin Recapitulates Human Hereditary Myopathy and Cataracts ». *PLoS One* 6 (3): e17671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017671>.
- Antonioni, Ambra, Ivan Dimauro, Cristina Fantini, Rosario Barone, Filippo Macaluso, Valentina Di Felice, et Daniela Caporossi. 2020. « AB-Crystallin Response to a pro-Oxidant Non-Cytotoxic Environment in Murine Cardiac Cells: An “in Vitro” and “in Vivo” Study ». *Free Radical Biology & Medicine* 152 (mai): 301-12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.013>.
- Antrobus, Robin, et Georg H. H. Borner. 2011. « Improved Elution Conditions for Native Co-Immunoprecipitation ». *PLoS One* 6 (3): e18218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018218>.
- Arias, Edward B., Junghoon Kim, et Gregory D. Cartee. 2004. « Prolonged Incubation in PUGNAc Results in Increased Protein O-Linked Glycosylation and Insulin Resistance in Rat Skeletal Muscle ». *Diabetes* 53 (4): 921-30. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.921>.

- Arias-Calderón, Manuel, Gonzalo Almarza, Alexis Díaz-Vegas, Ariel Contreras-Ferrat, Denisse Valladares, Mariana Casas, Héctor Toledo, Enrique Jaimovich, et Sonja Buvinic. 2016. « Characterization of a Multiprotein Complex Involved in Excitation-Transcription Coupling of Skeletal Muscle ». *Skeletal Muscle* 6: 15. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0087-5>.
- Arnold, S. E., G. S. Smutzer, J. Q. Trojanowski, et P. J. Moberg. 1998. « Cellular and Molecular Neuropathology of the Olfactory Epithelium and Central Olfactory Pathways in Alzheimer's Disease and Schizophrenia ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 855 (novembre): 762-75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10656.x>.
- Aweida, Dina, Inga Rudesky, Alexandra Volodin, Eitan Shimko, et Shenhav Cohen. 2018. « GSK3- β Promotes Calpain-1-Mediated Desmin Filament Depolymerization and Myofibril Loss in Atrophy ». *The Journal of Cell Biology* 217 (10): 3698-3714. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802018>.

B

- Bacigalupa, Zachary A., Chaitali H. Bhadiadra, et Mauricio J. Reginato. 2018. « O-GlcNAcylation: Key Regulator of Glycolytic Pathways ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 50 (3): 189-98. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9742-3>.
- Bakthisaran, Raman, Kranthi Kiran Akula, Ramakrishna Tangirala, et Ch Mohan Rao. 2016. « Phosphorylation of AB-Crystallin: Role in Stress, Aging and Patho-Physiological Conditions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (1 Pt B): 167-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.017>.
- Bakthisaran, Raman, Ramakrishna Tangirala, et Ch Mohan Rao. 2015. « Small Heat Shock Proteins: Role in Cellular Functions and Pathology ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1854 (4): 291-319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>.
- Balana, Aaron T., Stuart P. Moon, et Matthew R. Pratt. 2021. « O-GlcNAcylated Peptides and Proteins for Structural and Functional Studies ». *Current Opinion in Structural Biology* 68 (juin): 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.12.005>.
- Baldini, Steffi F., Agata Steenackers, Stéphanie Olivier-Van Stichelen, Anne-Marie Mir, Marlène Mortuaire, Tony Lefebvre, et Céline Guinez. 2016. « Glucokinase Expression Is Regulated by Glucose through O-GlcNAc Glycosylation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (2): 942-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.056>.
- Balsollier, Cyril, Roland J. Pieters, et Marko Anderluh. 2021. « Overview of the Assays to Probe O-Linked β -N-Acetylglucosamine Transferase Binding and Activity ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (4): 1037. <https://doi.org/10.3390/molecules26041037>.
- Banerjee, Partha S., Gerald W. Hart, et Jin Won Cho. 2013. « Chemical Approaches to Study O-GlcNAcylation ». *Chemical Society Reviews* 42 (10): 4345-57. <https://doi.org/10.1039/c2cs35412h>.
- Bang, Marie-Louise, Carol Gregorio, et Siegfried Labeit. 2002. « Molecular Dissection of the Interaction of Desmin with the C-Terminal Region of Nebulin ». *Journal of Structural Biology* 137 (1-2): 119-27. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4457>.
- Bär, Harald, Bertrand Goudeau, Sarah Wälde, Monique Casteras-Simon, Norbert Mücke, Alexey Shatunov, Y. Paul Goldberg, et al. 2007. « Conspicuous Involvement of Desmin Tail Mutations in Diverse Cardiac and Skeletal Myopathies ». *Human Mutation* 28 (4): 374-86. <https://doi.org/10.1002/humu.20459>.
- Bär, Harald, Norbert Mücke, Anna Kostareva, Gunnar Sjöberg, Ueli Aebi, et Harald Herrmann. 2005. « Severe Muscle Disease-Causing Desmin Mutations Interfere with in Vitro Filament Assembly at Distinct Stages ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (42): 15099-104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504568102>.
- Bär, Harald, Norbert Mücke, Philippe Ringler, Shirley A. Müller, Laurent Kreplak, Hugo A. Katus, Ueli Aebi, et Harald Herrmann. 2006. « Impact of Disease Mutations on the Desmin Filament Assembly Process ». *Journal of Molecular Biology* 360 (5): 1031-42. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.068>.
- Bär, Harald, Sergei V. Strelkov, Gunnar Sjöberg, Ueli Aebi, et Harald Herrmann. 2004. « The Biology of Desmin Filaments: How Do Mutations Affect Their Structure, Assembly, and Organisation? » *Journal of Structural Biology* 148 (2): 137-52. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.04.003>.
- Barbet, J. P., L. E. Thornell, et G. S. Butler-Browne. 1991. « Immunocytochemical Characterisation of Two Generations of Fibers during the Development of the Human Quadriceps Muscle ». *Mechanisms of Development* 35 (1): 3-11. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(91\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0925-4773(91)90036-6).

- Baron, Caroline Pascale, Susanne Jacobsen, et Peter Patrick Purslow. 2004. « Cleavage of Desmin by Cysteine Proteases: Calpains and Cathepsin B ». *Meat Science* 68 (3): 447-56. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.03.019>.
- Becker, Robert, Marina Leone, et Felix B. Engel. 2020. « Microtubule Organization in Striated Muscle Cells ». *Cells* 9 (6): E1395. <https://doi.org/10.3390/cells9061395>.
- Beltrao, Pedro, Peer Bork, Nevan J. Krogan, et Vera van Noort. 2013. « Evolution and Functional Cross-Talk of Protein Post-Translational Modifications ». *Molecular Systems Biology* 9: 714. <https://doi.org/10.1002/msb.201304521>.
- Bermúdez-Jiménez, Francisco José, Víctor Carriel, Andreas Brodehl, Miguel Alaminos, Antonio Campos, Ilona Schirmer, Hendrik Milting, et al. 2018. « Novel Desmin Mutation p.Glu401Asp Impairs Filament Formation, Disrupts Cell Membrane Integrity, and Causes Severe Arrhythmogenic Left Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia ». *Circulation* 137 (15): 1595-1610. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028719>.
- Bertolotti, Anne. 2018. « The Split Protein Phosphatase System ». *The Biochemical Journal* 475 (23): 3707-23. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170726>.
- Bhosle, Rahul C., Daniel E. Michele, Kevin P. Campbell, Zhenlin Li, et Richard M. Robson. 2006. « Interactions of Intermediate Filament Protein Synemin with Dystrophin and Utrophin ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (3): 768-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.192>.
- Birney, Ewan. 2021. « The International Human Genome Project ». *Human Molecular Genetics* 30 (R2): R161-63. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab198>.
- Blau, H. M., C. P. Chiu, et C. Webster. 1983. « Cytoplasmic Activation of Human Nuclear Genes in Stable Heterocaryons ». *Cell* 32 (4): 1171-80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90300-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90300-8).
- Boelens, Wilbert C. 2014. « Cell Biological Roles of AB-Crystallin ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 115 (1): 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.005>.
- Bonaldo, Paolo, et Marco Sandri. 2013. « Cellular and Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy ». *Disease Models & Mechanisms* 6 (1): 25-39. <https://doi.org/10.1242/dmm.010389>.
- Boncoraglio, Alessandra, Melania Minoia, et Serena Carra. 2012. « The Family of Mammalian Small Heat Shock Proteins (HSPBs): Implications in Protein Deposit Diseases and Motor Neuropathies ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (10): 1657-69. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.011>.
- Bond, Michelle R., et John A. Hanover. 2015. « A Little Sugar Goes a Long Way: The Cell Biology of O-GlcNAc ». *The Journal of Cell Biology* 208 (7): 869-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501101>.
- Boonyarom, O., et K. Inui. 2006. « Atrophy and Hypertrophy of Skeletal Muscles: Structural and Functional Aspects ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 188 (2): 77-89. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01613.x>.
- Borgo, Christian, Claudio D'Amore, Stefania Sarno, Mauro Salvi, et Maria Ruzzene. 2021. « Protein Kinase CK2: A Potential Therapeutic Target for Diverse Human Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 183. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00567-7>.
- Bouvet, Marion, Emilie Dubois-Deruy, Tchilabalo Dilezitoko Alayi, Paul Mulder, Myriam El Amranii, Olivia Beseme, Philippe Amouyel, Vincent Richard, Stanislas Tomavo, et Florence Pinet. 2016. « Increased Level of Phosphorylated Desmin and Its Degradation Products in Heart Failure ». *Biochemistry and Biophysics Reports* 6 (juillet): 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.02.014>.
- Bouvet, Marion, Emilie Dubois-Deruy, Annie Turkieh, Paul Mulder, Victoriane Peugnet, Maggy Chwastyniak, Olivia Beseme, et al. 2021. « Desmin Aggrephagy in Rat and Human Ischemic Heart Failure through PKC ζ and GSK3 β as Upstream Signaling Pathways ». *Cell Death Discovery* 7 (1): 153. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00549-2>.
- Brady, J. P., D. L. Garland, D. E. Green, E. R. Tamm, F. J. Giblin, et E. F. Wawrousek. 2001. « AlphaB-Crystallin in Lens Development and Muscle Integrity: A Gene Knockout Approach ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (12): 2924-34.
- Breckler, J., et E. Lazarides. 1982. « Isolation of a New High Molecular Weight Protein Associated with Desmin and Vimentin Filaments from Avian Embryonic Skeletal Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 92 (3): 795-806. <https://doi.org/10.1083/jcb.92.3.795>.
- Brinkmeier, Heinrich, et Kay Ohlendieck. 2014. « Chaperoning Heat Shock Proteins: Proteomic Analysis and Relevance for Normal and Dystrophin-Deficient Muscle ». *Proteomics. Clinical Applications* 8 (11-12): 875-95. <https://doi.org/10.1002/prca.201400015>.
- Brodehl, Andreas, Mareike Dieding, Niklas Biere, Andreas Unger, Bärbel Klauke, Volker Walhorn, Jan Gummert, et al. 2016. « Functional Characterization of the Novel DES Mutation p.L136P Associated with Dilated

- Cardiomyopathy Reveals a Dominant Filament Assembly Defect ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 91 (février): 207-14. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.015>.
- Brodehl, Andreas, Anna Gaertner-Rommel, et Hendrik Milting. 2018. « Molecular Insights into Cardiomyopathies Associated with Desmin (DES) Mutations ». *Biophysical Reviews* 10 (4): 983-1006. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0429-0>.
- Brodehl, Andreas, Per Niklas Hedde, Mareike Dieding, Azra Fatima, Volker Walhorn, Susan Gayda, Tomo Šarić, et al. 2012. « Dual Color Photoactivation Localization Microscopy of Cardiomyopathy-Associated Desmin Mutants ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 16047-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.313841>.
- Brodehl, Andreas, Seyed Ahmad Pour Hakimi, Caroline Stanasiuk, Sandra Ratnavadivel, Doris Hendig, Anna Gaertner, Brenda Gerull, Jan Gummert, Lech Paluszkiwicz, et Hendrik Milting. 2019. « Restrictive Cardiomyopathy Is Caused by a Novel Homozygous Desmin (DES) Mutation p.Y122H Leading to a Severe Filament Assembly Defect ». *Genes* 10 (11): E918. <https://doi.org/10.3390/genes10110918>.
- Bullen, John W., Jeremy L. Balsbaugh, Dipanjan Chanda, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, Dietbert Neumann, et Gerald W. Hart. 2014. « Cross-Talk between Two Essential Nutrient-Sensitive Enzymes: O-GlcNAc Transferase (OGT) and AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (15): 10592-606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523068>.
- Burattini, S., P. Ferri, M. Battistelli, R. Curci, F. Luchetti, et E. Falcieri. 2004. « C2C12 Murine Myoblasts as a Model of Skeletal Muscle Development: Morpho-Functional Characterization ». *European Journal of Histochemistry: EJH* 48 (3): 223-33.
- Burnett, G., et E. P. Kennedy. 1954. « The Enzymatic Phosphorylation of Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 211 (2): 969-80.
- Butkinaree, Chutikarn, Kyoungsook Park, et Gerald W. Hart. 2010. « O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive Crosstalk with Phosphorylation to Regulate Signaling and Transcription in Response to Nutrients and Stress ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.018>.

C

- Câmara-Pereira, E. S., L. M. Campos, M. A. Vannier-Santos, C. S. Mermelstein, et M. L. Costa. 2009. « Distribution of Cytoskeletal and Adhesion Proteins in Adult Zebrafish Skeletal Muscle ». *Histology and Histopathology* 24 (2): 187-96. <https://doi.org/10.14670/HH-24.187>.
- Cao, Weiqian, Jing Cao, Jiangming Huang, Jun Yao, Guoquan Yan, Haoqi Xu, et Pengyuan Yang. 2013. « Discovery and Confirmation of O-GlcNAcylated Proteins in Rat Liver Mitochondria by Combination of Mass Spectrometry and Immunological Methods ». *PloS One* 8 (10): e76399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076399>.
- Capetanaki, Y. G., J. Ngai, et E. Lazarides. 1984. « Characterization and Regulation in the Expression of a Gene Coding for the Intermediate Filament Protein Desmin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (22): 6909-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.22.6909>.
- Capetanaki, Y., D. J. Milner, et G. Weitzer. 1997. « Desmin in Muscle Formation and Maintenance: Knockouts and Consequences ». *Cell Structure and Function* 22 (1): 103-16. <https://doi.org/10.1247/csf.22.103>.
- Capetanaki, Yassemi, Robert J. Bloch, Asimina Kouloumenta, Manolis Mavroidis, et Stelios Psarras. 2007. « Muscle Intermediate Filaments and Their Links to Membranes and Membranous Organelles ». *Experimental Cell Research* 313 (10): 2063-76. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.033>.
- Capetanaki, Yassemi, Stamatis Papanthanasidou, Antigoni Diokmetzidou, Giannis Vatsellas, et Mary Tsikitis. 2015. « Desmin Related Disease: A Matter of Cell Survival Failure ». *Current Opinion in Cell Biology* 32 (février): 113-20. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.004>.
- Carlisle, Casey, Kendal Prill, et Dave Pilgrim. 2017. « Chaperones and the Proteasome System: Regulating the Construction and Demolition of Striated Muscle ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1): E32. <https://doi.org/10.3390/ijms19010032>.
- Carlsson, L., et L. E. Thornell. 2001. « Desmin-Related Myopathies in Mice and Man ». *Acta Physiologica Scandinavica* 171 (3): 341-48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00837.x>.
- Caron, A., et F. Chapon. 1999. « Desmin Phosphorylation Abnormalities in Cytoplasmic Body and Desmin-Related Myopathies ». *Muscle & Nerve* 22 (8): 1122-25. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199908\)22:8<1122::aid-mus17>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199908)22:8<1122::aid-mus17>3.0.co;2-t).

- Cartaud, A., B. J. Jasmin, J. P. Changeux, et J. Cartaud. 1995. « Direct Involvement of a Lamin-B-Related (54 KDa) Protein in the Association of Intermediate Filaments with the Postsynaptic Membrane of the Torpedo Marmorata Electrocyte ». *Journal of Cell Science* 108 (Pt 1) (janvier): 153-60. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.1.153>.
- Castellani, Loriana, Erica Salvati, Stefano Alemà, et Germana Falcone. 2006. « Fine Regulation of RhoA and Rock Is Required for Skeletal Muscle Differentiation ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (22): 15249-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601390200>.
- Charrier, Elisabeth E., Atef Asnacios, Rachel Milloud, Richard De Mets, Martial Balland, Florence Delort, Olivier Cardoso, Patrick Vicart, Sabrina Batonnet-Pichon, et Sylvie Hénon. 2016. « Desmin Mutation in the C-Terminal Domain Impairs Traction Force Generation in Myoblasts ». *Biophysical Journal* 110 (2): 470-80. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.3518>.
- Charrier, Elisabeth E., et Paul A. Janmey. 2016. « Mechanical Properties of Intermediate Filament Proteins ». *Methods in Enzymology* 568: 35-57. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.09.009>.
- Charrier, Elisabeth E., Lorraine Montel, Atef Asnacios, Florence Delort, Patrick Vicart, François Gallet, Sabrina Batonnet-Pichon, et Sylvie Hénon. 2018. « The Desmin Network Is a Determinant of the Cytoplasmic Stiffness of Myoblasts ». *Biology of the Cell* 110 (4): 77-90. <https://doi.org/10.1111/boc.201700040>.
- Chatham, John C., Jianhua Zhang, et Adam R. Wende. 2021. « Role of O-Linked N-Acetylglucosamine Protein Modification in Cellular (Patho)Physiology ». *Physiological Reviews* 101 (2): 427-93. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2019>.
- Chávez Zobel, Aura T., Anne Loranger, Normand Marceau, Jimmy R. Thériault, Herman Lambert, et Jacques Landry. 2003. « Distinct Chaperone Mechanisms Can Delay the Formation of Aggresomes by the Myopathy-Causing R120G AlphaB-Crystallin Mutant ». *Human Molecular Genetics* 12 (13): 1609-20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg173>.
- Chen, Hao, Sumana Venkat, Paige McGuire, Qinglei Gan, et Chenguang Fan. 2018. « Recent Development of Genetic Code Expansion for Posttranslational Modification Studies ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (7): E1662. <https://doi.org/10.3390/molecules23071662>.
- Chen, Qianqian, Jichao Huang, Feng Huang, Ming Huang, et Guanghong Zhou. 2014. « Influence of Oxidation on the Susceptibility of Purified Desmin to Degradation by μ -Calpain, Caspase-3 and -6 ». *Food Chemistry* 150 (mai): 220-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.149>.
- Chen, Yabing, Xinyang Zhao, et Hui Wu. 2019. « Metabolic Stress and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: The Role of Protein O-GlcNAc Modification ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39 (10): 1911-24. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312192>.
- Cheng, Fang, et John E. Eriksson. 2017. « Intermediate Filaments and the Regulation of Cell Motility during Regeneration and Wound Healing ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (9): a022046. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022046>.
- Cheng, Ting-Jen, Yu-Fang Tseng, Whei-Meih Chang, Margaret Dah-Tsyr Chang, et Yiu-Kay Lai. 2003. « Retaining of the Assembly Capability of Vimentin Phosphorylated by Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase-2 ». *Journal of Cellular Biochemistry* 89 (3): 589-602. <https://doi.org/10.1002/jcb.10511>.
- Chernova, Liliya S., Mikhail I. Bogachev, Vitaly V. Chasov, Innokentii E. Vishnyakov, et Airat R. Kayumov. 2020. « N- and C-Terminal Regions of the Small Heat Shock Protein IbpA from *Acholeplasma laidlawii* Competitively Govern Its Oligomerization Pattern and Chaperone-like Activity ». *RSC Advances* 10 (14): 8364-76. <https://doi.org/10.1039/c9ra10172a>.
- Cheung, Win D., et Gerald W. Hart. 2008. « AMP-Activated Protein Kinase and P38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13009-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801222200>.
- Cheung, Win D., Kaoru Sakabe, Michael P. Housley, Wagner B. Dias, et Gerald W. Hart. 2008. « O-Linked Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase Substrate Specificity Is Regulated by Myosin Phosphatase Targeting and Other Interacting Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (49): 33935-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806199200>.
- Choi, Sunkyuu, Jonathan Kelber, Xinning Jiang, Jan Strnad, Ken Fujimura, Martina Pasillas, Judith Coppinger, et Richard Klemke. 2014. « Procedures for the Biochemical Enrichment and Proteomic Analysis of the Cytoskeleton ». *Analytical Biochemistry* 446 (février): 102-7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.025>.
- Chou, T. Y., G. W. Hart, et C. V. Dang. 1995. « C-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (32): 18961-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.18961>.

- Chun, Yoon Sun, Yurim Park, Hyun Geun Oh, Tae-Wan Kim, Hyun Ok Yang, Myoung Kyu Park, et Sungkwon Chung. 2015. « O-GlcNAcylation Promotes Non-Amyloidogenic Processing of Amyloid- β Protein Precursor via Inhibition of Endocytosis from the Plasma Membrane ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 44 (1): 261-75. <https://doi.org/10.3233/JAD-140096>.
- Cieniewski-Bernard, C., V. Montel, L. Stevens, et B. Bastide. 2009. « O-GlcNAcylation, an Original Modulator of Contractile Activity in Striated Muscle ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 30 (7-8): 281-87. <https://doi.org/10.1007/s10974-010-9201-1>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Bruno Bastide, Tony Lefebvre, Jérôme Lemoine, Yvonne Mounier, et Jean-Claude Michalski. 2004. « Identification of O-Linked N-Acetylglucosamine Proteins in Rat Skeletal Muscle Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 3 (6): 577-85. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400024-MCP200>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Erwan Dupont, Barbara Deracinois, Matthias Lambert, et Bruno Bastide. 2014. « Multiplexed Detection of O-GlcNAc, Phosphoproteome, and Whole Proteome within the Same Gel ». *Frontiers in Endocrinology* 5: 184. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00184>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Erwan Dupont, Elodie Richard, et Bruno Bastide. 2014. « Phospho-GlcNAc Modulation of Slow MLC2 during Soleus Atrophy through a Multienzymatic and Sarcomeric Complex ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 466 (11): 2139-51. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1453-y>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Matthias Lambert, Erwan Dupont, Valérie Montel, Laurence Stevens, et Bruno Bastide. 2014. « O-GlcNAcylation, Contractile Protein Modifications and Calcium Affinity in Skeletal Muscle ». *Frontiers in Physiology* 5: 421. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00421>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Valerie Montel, Serge Berthoin, et Bruno Bastide. 2012. « Increasing O-GlcNAcylation Level on Organ Culture of Soleus Modulates the Calcium Activation Parameters of Muscle Fibers ». *PLoS One* 7 (10): e48218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048218>.
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Yvonne Mounier, Jean-Claude Michalski, et Bruno Bastide. 2006. « O-GlcNAc Level Variations Are Associated with the Development of Skeletal Muscle Atrophy ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 100 (5): 1499-1505. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00865.2005>.
- Ciryam, Prajwal, Gian Gaetano Tartaglia, Richard I. Morimoto, Christopher M. Dobson, et Michele Vendruscolo. 2013. « Widespread Aggregation and Neurodegenerative Diseases Are Associated with Supersaturated Proteins ». *Cell Reports* 5 (3): 781-90. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.043>.
- Claeys, K. G., M. Fardeau, R. Schröder, T. Suominen, K. Tolksdorf, A. Behin, O. Dubourg, et al. 2008. « Electron Microscopy in Myofibrillar Myopathies Reveals Clues to the Mutated Gene ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 18 (8): 656-66. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.06.367>.
- Claeys, Kristl G., et Michel Fardeau. 2013. « Myofibrillar Myopathies ». *Handbook of Clinical Neurology* 113: 1337-42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00005-8>.
- Claeyssen, Charlotte, Bruno Bastide, et Caroline Cieniewski-Bernard. 2022. « Global O-GlcNAcylation Changes Impact Desmin Phosphorylation and Its Partition toward Cytoskeleton in C2C12 Skeletal Muscle Cells Differentiated into Myotubes ». *Scientific Reports* 12 (1): 9831. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14033-z>.
- Clark, John I. 2016. « Functional Sequences in Human AlphaB Crystallin ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (1 Pt B): 240-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.014>.
- Clark, Kathleen A., Abigail S. McElhinny, Mary C. Beckerle, et Carol C. Gregorio. 2002. « Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18: 637-706. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105840>.
- Clemen, Christoph S., Dirk Fischer, Udo Roth, Stéphanie Simon, Patrick Vicart, Kanefusa Kato, Anna M. Kaminska, et al. 2005. « Hsp27-2D-Gel Electrophoresis Is a Diagnostic Tool to Differentiate Primary Desminopathies from Myofibrillar Myopathies ». *FEBS Letters* 579 (17): 3777-82. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.05.051>.
- Clemen, Christoph S., Harald Herrmann, Sergei V. Strelkov, et Rolf Schröder. 2013. « Desminopathies: Pathology and Mechanisms ». *Acta Neuropathologica* 125 (1): 47-75. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1057-6>.
- Clemen, Christoph S., Florian Stöckigt, Karl-Heinz Strucksberg, Frederic Chevessier, Lilli Winter, Johanna Schütz, Ralf Bauer, et al. 2015. « The Toxic Effect of R350P Mutant Desmin in Striated Muscle of Man and Mouse ». *Acta Neuropathologica* 129 (2): 297-315. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1363-2>.

- Cohen, Shenhav. 2020. « Role of Calpains in Promoting Desmin Filaments Depolymerization and Muscle Atrophy ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1867 (10): 118788. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118788>.
- Cohen, Shenhav, Bo Zhai, Steven P. Gygi, et Alfred L. Goldberg. 2012. « Ubiquitylation by Trim32 Causes Coupled Loss of Desmin, Z-Bands, and Thin Filaments in Muscle Atrophy ». *The Journal of Cell Biology* 198 (4): 575-89. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110067>.
- Collier, Miranda P., et Justin L. P. Benesch. 2020. « Small Heat-Shock Proteins and Their Role in Mechanical Stress ». *Cell Stress & Chaperones* 25 (4): 601-13. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01095-z>.
- Comer, F. I., K. Vosseller, L. Wells, M. A. Accavitti, et G. W. Hart. 2001. « Characterization of a Mouse Monoclonal Antibody Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Analytical Biochemistry* 293 (2): 169-77. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5132>.
- Cooper, John A. 2002. « Actin Dynamics: Tropomyosin Provides Stability ». *Current Biology: CB* 12 (15): R523-525. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01028-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01028-x).
- Copeland, Ronald J., John W. Bullen, et Gerald W. Hart. 2008. « Cross-Talk between GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Insulin Resistance and Glucose Toxicity ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (1): E17-28. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90281.2008>.
- Costa, M. L., R. Escaleira, A. Cataldo, F. Oliveira, et C. S. Mermelstein. 2004. « Desmin: Molecular Interactions and Putative Functions of the Muscle Intermediate Filament Protein ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 37 (12): 1819-30. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001200007>.
- Costa, Manoel L., Roberta C. Escaleira, Fernanda Jazenko, et Claudia S. Mermelstein. 2008. « Cell Adhesion in Zebrafish Myogenesis: Distribution of Intermediate Filaments, Microfilaments, Intracellular Adhesion Structures and Extracellular Matrix ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65 (10): 801-15. <https://doi.org/10.1002/cm.20301>.
- Coussement, Pieter, David Bauwens, Gert Peters, Jo Maertens, et Marjan De Mey. 2020. « Mapping and Refactoring Pathway Control through Metabolic and Protein Engineering: The Hexosamine Biosynthesis Pathway ». *Biotechnology Advances* 40 (juin): 107512. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107512>.
- Craig, Roger, et John L. Woodhead. 2006. « Structure and Function of Myosin Filaments ». *Current Opinion in Structural Biology* 16 (2): 204-12. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.006>.

D

- Dai, Chun-Ling, Jin-Hua Gu, Fei Liu, Khalid Iqbal, et Cheng-Xin Gong. 2018. « Neuronal O-GlcNAc Transferase Regulates Appetite, Body Weight, and Peripheral Insulin Resistance ». *Neurobiology of Aging* 70 (octobre): 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.05.036>.
- D'Amico, Daniela, Roberto Fiore, Daniela Caporossi, Valentina Di Di Felice, Francesco Cappello, Ivan Dimauro, et Rosario Barone. 2021. « Function and Fiber-Type Specific Distribution of Hsp60 and AB-Crystallin in Skeletal Muscles: Role of Physical Exercise ». *Biology* 10 (2): 77. <https://doi.org/10.3390/biology10020077>.
- Dang, Kai, Shanfeng Jiang, Yuan Gao, et Airong Qian. 2022. « The Role of Protein Glycosylation in Muscle Diseases ». *Molecular Biology Reports* 49 (8): 8037-49. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07334-z>.
- Datta, Kaberi, Trayambak Basak, Swati Varshney, Shantanu Sengupta, et Sagartirtha Sarkar. 2017. « Quantitative Proteomic Changes during Post Myocardial Infarction Remodeling Reveals Altered Cardiac Metabolism and Desmin Aggregation in the Infarct Region ». *Journal of Proteomics* 152 (janvier): 283-99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.11.017>.
- De Souza, David P. 2013. « Detection of Polar Metabolites through the Use of Gas Chromatography-Mass Spectrometry ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1055: 29-37. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_3.
- Decourcelle, Amélie, Ingrid Loison, Steffi Baldini, Dominique Leprince, et Vanessa Dehennaut. 2020. « Evidence of a Compensatory Regulation of Colonic O-GlcNAc Transferase and O-GlcNAcase Expression in Response to Disruption of O-GlcNAc Homeostasis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 521 (1): 125-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.090>.

- Dehennaut, Vanessa, et Tony Lefebvre. 2013. « Proteomics and PUGNAcity Will Overcome Questioning of Insulin Resistance Induction by Nonselective Inhibition of O-GlcNAcase ». *Proteomics* 13 (20): 2944-46. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300363>.
- Delort, Florence, Bertrand-David Segard, Coralie Hakibilen, Fany Bourgois-Rocha, Eva Cabet, Patrick Vicart, Meng-Er Huang, et al. 2019. « Alterations of Redox Dynamics and Desmin Post-Translational Modifications in Skeletal Muscle Models of Desminopathies ». *Experimental Cell Research* 383 (2): 111539. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111539>.
- Deracinois, Barbara, Luc Camoin, Matthias Lambert, Jean-Baptiste Boyer, Erwan Dupont, Bruno Bastide, et Caroline Cieniewski-Bernard. 2018. « O-GlcNAcylation Site Mapping by (Azide-Alkyne) Click Chemistry and Mass Spectrometry Following Intensive Fractionation of Skeletal Muscle Cells Proteins ». *Journal of Proteomics* 186 (août): 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.005>.
- Dey, Pranab, Jyoti Togra, et Suvradeep Mitra. 2014. « Intermediate Filament: Structure, Function, and Applications in Cytology ». *Diagnostic Cytopathology* 42 (7): 628-35. <https://doi.org/10.1002/dc.23132>.
- Dias, Wagner B., Win D. Cheung, et Gerald W. Hart. 2012. « O-GlcNAcylation of Kinases ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 422 (2): 224-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.124>.
- Dias, Wagner B., Win D. Cheung, Zihao Wang, et Gerald W. Hart. 2009. « Regulation of Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase IV by O-GlcNAc Modification ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (32): 21327-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007310>.
- Diermeier, Stefanie, Andreas Buttgereit, Sebastian Schürmann, Lilli Winter, Hongyang Xu, Robyn M. Murphy, Christoph S. Clemen, Rolf Schröder, et Oliver Friedrich. 2017. « Preaged Remodeling of Myofibrillar Cytoarchitecture in Skeletal Muscle Expressing R349P Mutant Desmin ». *Neurobiology of Aging* 58 (octobre): 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.001>.
- Diguet, Nicolas, Youssef Mallat, Romain Ladouce, Gilles Clodic, Alexandre Prola, Eva Tritsch, Jocelyne Blanc, et al. 2011. « Muscle Creatine Kinase Deficiency Triggers Both Actin Depolymerization and Desmin Disorganization by Advanced Glycation End Products in Dilated Cardiomyopathy ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (40): 35007-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252395>.
- Dimauro, Ivan, Ambra Antonioni, Neri Mercatelli, et Daniela Caporossi. 2018. « The Role of AB-Crystallin in Skeletal and Cardiac Muscle Tissues ». *Cell Stress & Chaperones* 23 (4): 491-505. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0866-x>.
- Dimauro, Ivan, et Daniela Caporossi. 2022. « Alpha B-Crystallin in Muscle Disease Prevention: The Role of Physical Activity ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (3): 1147. <https://doi.org/10.3390/molecules27031147>.
- Dong, D. L., et G. W. Hart. 1994. « Purification and Characterization of an O-GlcNAc Selective N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase from Rat Spleen Cytosol ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (30): 19321-30.
- Douzi, Badreddine. 2017. « Protein-Protein Interactions: Surface Plasmon Resonance ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1615: 257-75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_21.
- Dubois, Emilie, Vincent Richard, Paul Mulder, Nicolas Lamblin, Hervé Drobecq, Jean-Paul Henry, Philippe Amouyel, Christian Thuillez, Christophe Bauters, et Florence Pinet. 2011. « Decreased Serine207 Phosphorylation of Troponin T as a Biomarker for Left Ventricular Remodelling after Myocardial Infarction ». *European Heart Journal* 32 (1): 115-23. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq108>.

E

- Eaton, P., W. Fuller, J. R. Bell, et M. J. Shattock. 2001. « AlphaB Crystallin Translocation and Phosphorylation: Signal Transduction Pathways and Preconditioning in the Isolated Rat Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33 (9): 1659-71. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1418>.
- Ebashi, S., M. Endo, et I. Otsuki. 1969. « Control of Muscle Contraction ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 2 (4): 351-84. <https://doi.org/10.1017/s0033583500001190>.
- Ecroyd, Heath, Sarah Meehan, Joseph Horwitz, J. Andrew Aquilina, Justin L. P. Benesch, Carol V. Robinson, Cait E. Macphee, et John A. Carver. 2007. « Mimicking Phosphorylation of AlphaB-Crystallin Affects Its Chaperone Activity ». *The Biochemical Journal* 401 (1): 129-41. <https://doi.org/10.1042/BJ20060981>.
- Erickson, Jeffrey R. 2014. « Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart ». *Frontiers in Pharmacology* 5: 59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00059>.
- Erickson, Jeffrey R., Laetitia Pereira, Lianguo Wang, Guanghui Han, Amanda Ferguson, Khanh Dao, Ronald J. Copeland, et al. 2013. « Diabetic Hyperglycaemia Activates CaMKII and Arrhythmias by O-Linked Glycosylation ». *Nature* 502 (7471): 372-76. <https://doi.org/10.1038/nature12537>.

- Eriksson, J. E., D. L. Brautigan, R. Vallee, J. Olmsted, H. Fujiki, et R. D. Goldman. 1992. « Cytoskeletal Integrity in Interphase Cells Requires Protein Phosphatase Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 11093-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.11093>.
- Eriksson, J. E., P. Opal, et R. D. Goldman. 1992. « Intermediate Filament Dynamics ». *Current Opinion in Cell Biology* 4 (1): 99-104. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90065-k](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90065-k).
- Eriksson, John E., Thomas Dechat, Boris Grin, Brian Helfand, Melissa Mendez, Hanna-Mari Pallari, et Robert D. Goldman. 2009. « Introducing Intermediate Filaments: From Discovery to Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1763-71. <https://doi.org/10.1172/JCI38339>.
- Ervasti, James M. 2003. « Costameres: The Achilles' Heel of Herculean Muscle ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 13591-94. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200021200>.
- Etienne-Manneville, Sandrine. 2018. « Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (octobre): 1-28. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062534>.
- Eustice, Moriah, Michelle R. Bond, et John A. Hanover. 2017. « O-GlcNAc Cycling and the Regulation of Nucleocytoplasmic Dynamics ». *Biochemical Society Transactions* 45 (2): 427-36. <https://doi.org/10.1042/BST20160171>.

F

- Fahie, Kamau, Bhargavi Narayanan, Fiddia Zahra, Russell Reeves, Steve M. Fernandes, Gerald W. Hart, et Natasha E. Zachara. 2021. « Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Current Protocols* 1 (5): e129. <https://doi.org/10.1002/cpz1.129>.
- Falzarano, Maria Sofia, Chiara Scotton, Chiara Passarelli, et Alessandra Ferlini. 2015. « Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 20 (10): 18168-84. <https://doi.org/10.3390/molecules201018168>.
- Farach, Andrew M., et Deni S. Galileo. 2008. « O-GlcNAc Modification of Radial Glial Vimentin Filaments in the Developing Chick Brain ». *Brain Cell Biology* 36 (5-6): 191-202. <https://doi.org/10.1007/s11068-008-9036-5>.
- Fardini, Yann, Yobana Perez-Cervera, Luc Camoin, Patrick Pagesy, Tony Lefebvre, et Tarik Issad. 2015. « Regulatory O-GlcNAcylation Sites on FoxO1 Are yet to Be Identified ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 462 (2): 151-58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.114>.
- Farrell, F. X., C. M. Sax, et Z. E. Zehner. 1990. « A Negative Element Involved in Vimentin Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 10 (5): 2349-58. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.5.2349-2358.1990>.
- Fehl, Charlie, et John A. Hanover. 2022. « Tools, Tactics and Objectives to Interrogate Cellular Roles of O-GlcNAc in Disease ». *Nature Chemical Biology* 18 (1): 8-17. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00903-6>.
- Ferrer, C. M., T. Y. Lu, Z. A. Bacigalupa, C. D. Katsetos, D. A. Sinclair, et M. J. Reginato. 2017. « O-GlcNAcylation Regulates Breast Cancer Metastasis via SIRT1 Modulation of FOXM1 Pathway ». *Oncogene* 36 (4): 559-69. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.228>.
- Ferrer, Isidre, et Montse Olivé. 2008. « Molecular Pathology of Myofibrillar Myopathies ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10 (septembre): e25. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000793>.
- Fischer, Björn, Sven Dittmann, Andreas Brodehl, Andreas Unger, Birgit Stallmeyer, Matthias Paul, Guiscard Seeböhm, et al. 2021. « Functional Characterization of Novel Alpha-Helical Rod Domain Desmin (DES) Pathogenic Variants Associated with Dilated Cardiomyopathy, Atrioventricular Block and a Risk for Sudden Cardiac Death ». *International Journal of Cardiology* 329 (avril): 167-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.12.050>.
- Fischer, Charlotte, Konstanze Kleinschnitz, Arne Wrede, Ingrid Muth, Niels Kruse, Ichizo Nishino, et Jens Schmidt. 2013. « Cell Stress Molecules in the Skeletal Muscle of GNE Myopathy ». *BMC Neurology* 13 (mars): 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-24>.
- Fountoulakis, Michael, Elisavet Soumaka, Kleopatra Rapti, Manolis Mavroidis, George Tsangaris, Antony Maris, Noah Weisleder, et Yassemi Capetanaki. 2005. « Alterations in the Heart Mitochondrial Proteome in a Desmin Null Heart Failure Model ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (3): 461-74. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.12.008>.
- Frontera, Walter R., et Julien Ochala. 2015. « Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function ». *Calcified Tissue International* 96 (3): 183-95. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>.

Fujioka, Ko, Yuji Kubota, et Mutsuhiro Takekawa. 2018. « Wheat Germ Agglutinin (WGA)-SDS-PAGE: A Novel Method for the Detection of O-GlcNAc-modified Proteins by Lectin Affinity Gel Electrophoresis ». *Bio-protocol* 8 (23): e3098. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3098>.

G

- Gao, Lei, Leslie A. C. Blair, et John Marshall. 2006. « CaMKII-Independent Effects of KN93 and Its Inactive Analog KN92: Reversible Inhibition of L-Type Calcium Channels ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345 (4): 1606-10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.066>.
- Gao, Y., L. Wells, F. I. Comer, G. J. Parker, et G. W. Hart. 2001. « Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Cloning and Characterization of a Neutral, Cytosolic Beta-N-Acetylglucosaminidase from Human Brain ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (13): 9838-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010420200>.
- Gard, D. L., P. B. Bell, et E. Lazarides. 1979. « Coexistence of Desmin and the Fibroblastic Intermediate Filament Subunit in Muscle and Nonmuscle Cells: Identification and Comparative Peptide Analysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (8): 3894-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.8.3894>.
- Garrido, C., C. Paul, R. Seigneuric, et H. H. Kampinga. 2012. « The Small Heat Shock Proteins Family: The Long Forgotten Chaperones ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (10): 1588-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.022>.
- Gautel, Mathias. 2011. « The Sarcomeric Cytoskeleton: Who Picks up the Strain? » *Current Opinion in Cell Biology* 23 (1): 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.12.001>.
- Gautel, Mathias, et Kristina Djinović-Carugo. 2016. « The Sarcomeric Cytoskeleton: From Molecules to Motion ». *The Journal of Experimental Biology* 219 (Pt 2): 135-45. <https://doi.org/10.1242/jeb.124941>.
- Ge, Yun, Daniel H. Ramirez, Bo Yang, Alexandria K. D'Souza, Chant Aonbangkhen, Stephanie Wong, et Christina M. Woo. 2021. « Target Protein Deglycosylation in Living Cells by a Nanobody-Fused Split O-GlcNAcase ». *Nature Chemical Biology* 17 (5): 593-600. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00757-y>.
- Geisler, N., et K. Weber. 1980. « Purification of Smooth-Muscle Desmin and a Protein-Chemical Comparison of Desmins from Chicken Gizzard and Hog Stomach ». *European Journal of Biochemistry* 111 (2): 425-33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04957.x>.
- . 1988. « Phosphorylation of Desmin In Vitro Inhibits Formation of Intermediate Filaments; Identification of Three Kinase A Sites in the Aminoterminal Head Domain ». *The EMBO Journal* 7 (1): 15-20. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02778.x>.
- Gelfi, Cecilia, Michele Vasso, et Paolo Cerretelli. 2011. « Diversity of Human Skeletal Muscle in Health and Disease: Contribution of Proteomics ». *Journal of Proteomics* 74 (6): 774-95. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.028>.
- Ghosh, Joy G., Ananth K. Shenoy, et John I. Clark. 2007. « Interactions between Important Regulatory Proteins and Human AlphaB Crystallin ». *Biochemistry* 46 (21): 6308-17. <https://doi.org/10.1021/bi700149h>.
- Giovarelli, Matteo, Silvia Zecchini, Emanuele Martini, Massimiliano Garrè, Sara Barozzi, Michela Ripolone, Laura Napoli, et al. 2020. « Drp1 Overexpression Induces Desmin Disassembling and Drives Kinesin-1 Activation Promoting Mitochondrial Trafficking in Skeletal Muscle ». *Cell Death and Differentiation* 27 (8): 2383-2401. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0510-7>.
- Glass, David J. 2010. « PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 346: 267-78. https://doi.org/10.1007/82_2010_78.
- Gloster, Tracey M., et David J. Vocadlo. 2010. « Mechanism, Structure, and Inhibition of O-GlcNAc Processing Enzymes ». *Current Signal Transduction Therapy* 5 (1): 74-91. <https://doi.org/10.2174/157436210790226537>.
- Gloster, Tracey M., Wesley F. Zandberg, Julia E. Heinonen, David L. Shen, Lehua Deng, et David J. Vocadlo. 2011. « Hijacking a Biosynthetic Pathway Yields a Glycosyltransferase Inhibitor within Cells ». *Nature Chemical Biology* 7 (3): 174-81. <https://doi.org/10.1038/nchembio.520>.
- Goldfarb, L. G., K. Y. Park, L. Cervenáková, S. Gorokhova, H. S. Lee, O. Vasconcelos, J. W. Nagle, C. Semino-Mora, K. Sivakumar, et M. C. Dalakas. 1998. « Missense Mutations in Desmin Associated with Familial Cardiac and Skeletal Myopathy ». *Nature Genetics* 19 (4): 402-3. <https://doi.org/10.1038/1300>.

- Goldfarb, Lev G., et Marinos C. Dalakas. 2009. « Tragedy in a Heartbeat: Malfunctioning Desmin Causes Skeletal and Cardiac Muscle Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1806-13. <https://doi.org/10.1172/JCI38027>.
- Goldfarb, Lev G., Montse Olivé, Patrick Vicart, et Hans H. Goebel. 2008. « Intermediate Filament Diseases: Desminopathy ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 642: 131-64. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84847-1_11.
- Goldman, Robert D., Megan M. Cleland, S. N. Prasanna Murthy, Saleemulla Mahammad, et Edward R. Kuczmarski. 2012. « Inroads into the Structure and Function of Intermediate Filament Networks ». *Journal of Structural Biology* 177 (1): 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.017>.
- Goldmann, Wolfgang H. 2018. « Intermediate Filaments and Cellular Mechanics ». *Cell Biology International* 42 (2): 132-38. <https://doi.org/10.1002/cbin.10879>.
- Golenhofen, N., P. Htun, W. Ness, R. Koob, W. Schaper, et D. Drenckhahn. 1999. « Binding of the Stress Protein Alpha B-Crystallin to Cardiac Myofibrils Correlates with the Degree of Myocardial Damage during Ischemia/Reperfusion in Vivo ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31 (3): 569-80. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0892>.
- Golenhofen, N., W. Ness, R. Koob, P. Htun, W. Schaper, et D. Drenckhahn. 1998. « Ischemia-Induced Phosphorylation and Translocation of Stress Protein Alpha B-Crystallin to Z Lines of Myocardium ». *The American Journal of Physiology* 274 (5): H1457-1464. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1457>.
- Gordon, A. M., E. Homsher, et M. Regnier. 2000. « Regulation of Contraction in Striated Muscle ». *Physiological Reviews* 80 (2): 853-924. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>.
- Granger, B. L., et E. Lazarides. 1980. « Synemin: A New High Molecular Weight Protein Associated with Desmin and Vimentin Filaments in Muscle ». *Cell* 22 (3): 727-38. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90549-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90549-8).
- Griffith, L. S., M. Mathes, et B. Schmitz. 1995. « Beta-Amyloid Precursor Protein Is Modified with O-Linked N-Acetylglucosamine ». *Journal of Neuroscience Research* 41 (2): 270-78. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410214>.
- Griffith, L. S., et B. Schmitz. 1999. « O-Linked N-Acetylglucosamine Levels in Cerebellar Neurons Respond Reciprocally to Perturbations of Phosphorylation ». *European Journal of Biochemistry* 262 (3): 824-31. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00439.x>.
- Grose, Julianne H., Kelsey Langston, Xiaohui Wang, Shayne Squires, Soumyajit Banerjee Mustafi, Whitney Hayes, Jonathan Neubert, et al. 2015. « Characterization of the Cardiac Overexpression of HSPB2 Reveals Mitochondrial and Myogenic Roles Supported by a Cardiac HspB2 Interactome ». *PloS One* 10 (10): e0133994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133994>.
- Gual, Philippe, Yannick Le Marchand-Brustel, et Jean-François Tanti. 2005. « Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling through IRS-1 Phosphorylation ». *Biochimie* 87 (1): 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.019>.
- Guinez, Céline, Anne-Marie Mir, Vanessa Dehennaut, René Cacan, Anne Harduin-Lepers, Jean-Claude Michalski, et Tony Lefebvre. 2008. « Protein Ubiquitination Is Modulated by O-GlcNAc Glycosylation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (8): 2901-11. <https://doi.org/10.1096/fj.07-102509>.

H

- Hahne, Hannes, Nadine Sobotzki, Tamara Nyberg, Dominic Helm, Vladimir S. Borodkin, Daan M. F. van Aalten, Brian Agnew, et Bernhard Kuster. 2013. « Proteome Wide Purification and Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins Using Click Chemistry and Mass Spectrometry ». *Journal of Proteome Research* 12 (2): 927-36. <https://doi.org/10.1021/pr300967y>.
- Haltiwanger, R. S., M. A. Blomberg, et G. W. Hart. 1992. « Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins. Purification and Characterization of a Uridine Diphospho-N-Acetylglucosamine:Polypeptide Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (13): 9005-13.
- Haltiwanger, R. S., G. D. Holt, et G. W. Hart. 1990. « Enzymatic Addition of O-GlcNAc to Nuclear and Cytoplasmic Proteins. Identification of a Uridine Diphospho-N-Acetylglucosamine:Peptide Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (5): 2563-68.

- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. « The Hallmarks of Cancer ». *Cell* 100 (1): 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Hanover, J. A., C. K. Cohen, M. C. Willingham, et M. K. Park. 1987. « O-Linked N-Acetylglucosamine Is Attached to Proteins of the Nuclear Pore. Evidence for Cytoplasmic and Nucleoplasmic Glycoproteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 262 (20): 9887-94.
- Hanover, J. A., Z. Lai, G. Lee, W. A. Lubas, et S. M. Sato. 1999. « Elevated O-Linked N-Acetylglucosamine Metabolism in Pancreatic Beta-Cells ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 362 (1): 38-45. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1016>.
- Hanover, John A., Michael W. Krause, et Dona C. Love. 2010. « The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc Cycling in Feast or Famine ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 80-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.017>.
- Hardivillé, Stéphan, et Gerald W. Hart. 2014. « Nutrient Regulation of Signaling, Transcription, and Cell Physiology by O-GlcNAcylation ». *Cell Metabolism* 20 (2): 208-13. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.014>.
- Hargreaves, Mark, et Lawrence L. Spriet. 2020. « Skeletal Muscle Energy Metabolism during Exercise ». *Nature Metabolism* 2 (9): 817-28. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>.
- Hart, G. W. 1997. « Dynamic O-Linked Glycosylation of Nuclear and Cytoskeletal Proteins ». *Annual Review of Biochemistry* 66: 315-35. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.315>.
- Hart, Gerald W., Chad Slawson, Genaro Ramirez-Correa, et Olof Lagerlof. 2011. « Cross Talk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 80: 825-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>.
- Hartweck, Lynn M., Cheryl L. Scott, et Neil E. Olszewski. 2002. « Two O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Genes of Arabidopsis Thaliana L. Heynh. Have Overlapping Functions Necessary for Gamete and Seed Development ». *Genetics* 161 (3): 1279-91. <https://doi.org/10.1093/genetics/161.3.1279>.
- Haslbeck, Martin, Jirka Peschek, Johannes Buchner, et Sevil Weinkauf. 2016. « Structure and Function of α -Crystallins: Traversing from in Vitro to in Vivo ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (1 Pt B): 149-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.008>.
- Haubold, Kurt W., David L. Allen, Yassemi Capetanaki, et Leslie A. Leinwand. 2003. « Loss of Desmin Leads to Impaired Voluntary Wheel Running and Treadmill Exercise Performance ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 95 (4): 1617-22. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00408.2003>.
- He X, Gao J, Peng L, Hu T, Wan Y, Zhou M, Zhen P, Cao H. Bacterial O-GlcNAcase genes abundance decreases in ulcerative colitis patients and its administration ameliorates colitis in mice. *Gut*. 2021 Oct;70(10):1872-1883. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322468. Epub 2020 Dec 12. PMID: 33310751; PMCID: PMC8458092.
- Hédou, Julie, Bruno Bastide, Adeline Page, Jean-Claude Michalski, et Willy Morelle. 2009. « Mapping of O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine Modification Sites in Key Contractile Proteins of Rat Skeletal Muscle ». *Proteomics* 9 (8): 2139-48. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800617>.
- Hedou, Julie, Caroline Cieniewski-Bernard, Yves Leroy, Jean-Claude Michalski, Yvonne Mounier, et Bruno Bastide. 2007. « O-Linked N-Acetylglucosaminylation Is Involved in the Ca²⁺ Activation Properties of Rat Skeletal Muscle ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (14): 10360-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606787200>.
- Heimburg, T., J. Schuenemann, K. Weber, et N. Geisler. 1996. « Specific Recognition of Coiled Coils by Infrared Spectroscopy: Analysis of the Three Structural Domains of Type III Intermediate Filament Proteins ». *Biochemistry* 35 (5): 1375-82. <https://doi.org/10.1021/bi9515883>.
- Heling, A., R. Zimmermann, S. Kostin, Y. Maeno, S. Hein, B. Devaux, E. Bauer, et al. 2000. « Increased Expression of Cytoskeletal, Linkage, and Extracellular Proteins in Failing Human Myocardium ». *Circulation Research* 86 (8): 846-53. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.8.846>.
- Henderson, Christine A., Christopher G. Gomez, Stefanie M. Novak, Lei Mi-Mi, et Carol C. Gregorio. 2017. « Overview of the Muscle Cytoskeleton ». *Comprehensive Physiology* 7 (3): 891-944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>.
- Herrmann, H., et U. Aebi. 2000. « Intermediate Filaments and Their Associates: Multi-Talented Structural Elements Specifying Cytoarchitecture and Cytdynamics ». *Current Opinion in Cell Biology* 12 (1): 79-90. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00060-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00060-5).
- Herrmann, H., B. Fouquet, et W. W. Franke. 1989. « Expression of Intermediate Filament Proteins during Development of Xenopus Laevis. I. CDNA Clones Encoding Different Forms of Vimentin ». *Development (Cambridge, England)* 105 (2): 279-98. <https://doi.org/10.1242/dev.105.2.279>.

- Herrmann, Harald, et Ueli Aebi. 2016. « Intermediate Filaments: Structure and Assembly ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (11): a018242. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018242>.
- Herrmann, Harald, Michael Hesse, Michaela Reichenzeller, Ueli Aebi, et Thomas M. Magin. 2003. « Functional Complexity of Intermediate Filament Cytoskeletons: From Structure to Assembly to Gene Ablation ». *International Review of Cytology* 223: 83-175. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(05\)23003-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(05)23003-6).
- Herrmann, Harald, Sergei V. Strelkov, Peter Burkhard, et Ueli Aebi. 2009. « Intermediate Filaments: Primary Determinants of Cell Architecture and Plasticity ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1772-83. <https://doi.org/10.1172/JCI38214>.
- Hidalgo, Carlos, et Henk Granzier. 2013. « Tuning the Molecular Giant Titin through Phosphorylation: Role in Health and Disease ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 23 (5): 165-71. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.10.005>.
- Hnia, Karim, Caroline Ramsbacher, Julien Vermot, et Jocelyn Laporte. 2015. « Desmin in Muscle and Associated Diseases: Beyond the Structural Function ». *Cell and Tissue Research* 360 (3): 591-608. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2016-4>.
- Hnia, Karim, Helene Tronchère, Kinga K. Tomczak, Leonela Amoasii, Patrick Schultz, Alan H. Beggs, Bernard Payrastra, Jean Louis Mandel, et Jocelyn Laporte. 2011. « Myotubularin Controls Desmin Intermediate Filament Architecture and Mitochondrial Dynamics in Human and Mouse Skeletal Muscle ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 70-85. <https://doi.org/10.1172/JCI44021>.
- Höhfeld, Jörg, Thomas Benzing, Wilhelm Bloch, Dieter O. Fürst, Sebastian Gehlert, Michael Hesse, Bernd Hoffmann, et al. 2021. « Maintaining Proteostasis under Mechanical Stress ». *EMBO Reports* 22 (8): e52507. <https://doi.org/10.15252/embr.202152507>.
- Hol, Elly M., et Yassemi Capetanaki. 2017. « Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (12): a021642. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021642>.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, et W. Kabsch. 1990. « Atomic Model of the Actin Filament ». *Nature* 347 (6288): 44-49. <https://doi.org/10.1038/347044a0>.
- Holmes, Kenneth C., Isabel Angert, F. Jon Kull, Werner Jahn, et Rasmus R. Schröder. 2003. « Electron Cryo-Microscopy Shows How Strong Binding of Myosin to Actin Releases Nucleotide ». *Nature* 425 (6956): 423-27. <https://doi.org/10.1038/nature02005>.
- Holmes, Kenneth C., et William Lehman. 2008. « Gestalt-Binding of Tropomyosin to Actin Filaments ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 29 (6-8): 213-19. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9157-6>.
- Holt, G. D., R. S. Haltiwanger, C. R. Torres, et G. W. Hart. 1987. « Erythrocytes Contain Cytoplasmic Glycoproteins. O-Linked GlcNAc on Band 4.1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 262 (31): 14847-50.
- Hortemo, Kristin Halvorsen, Jan Magnus Aronsen, Ida G. Lunde, Ivar Sjaastad, Per Kristian Lunde, et Ole M. Sejersted. 2015. « Exhausting Treadmill Running Causes Dephosphorylation of SMLC2 and Reduced Level of Myofilament MLCK2 in Slow Twitch Rat Soleus Muscle ». *Physiological Reports* 3 (2): e12285. <https://doi.org/10.14814/phy2.12285>.
- Hortemo, Kristin Halvorsen, Per Kristian Lunde, Jan Haug Anonsen, Heidi Kvaløy, Morten Munkvik, Tommy Aune Rehn, Ivar Sjaastad, Ida Gjervold Lunde, Jan Magnus Aronsen, et Ole M. Sejersted. 2016. « Exercise Training Increases Protein O-GlcNAcylation in Rat Skeletal Muscle ». *Physiological Reports* 4 (18): e12896. <https://doi.org/10.14814/phy2.12896>.
- Houck, Scott A., Andrew Landsbury, John I. Clark, et Roy A. Quinlan. 2011. « Multiple Sites in AB-Crystallin Modulate Its Interactions with Desmin Filaments Assembled in Vitro ». *PLoS One* 6 (11): e25859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025859>.
- Hu, Ping, Shino Shimoji, et Gerald W. Hart. 2010. « Site-Specific Interplay between O-GlcNAcylation and Phosphorylation in Cellular Regulation ». *FEBS Letters* 584 (12): 2526-38. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.044>.
- Huang, Ming, Feng Huang, Mei Xue, Xinglian Xu, et Guanghong Zhou. 2011. « The Effect of Active Caspase-3 on Degradation of Chicken Myofibrillar Proteins and Structure of Myofibrils ». *Food Chemistry* 128 (1): 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.062>.
- Huang, Xupei, Jian Li, Dalton Foster, Sharon L. Lemanski, Dipak K. Dube, Chi Zhang, et Larry F. Lemanski. 2002. « Protein Kinase C-Mediated Desmin Phosphorylation Is Related to Myofibril Disarray in Cardiomyopathic Hamster Heart ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 227 (11): 1039-46. <https://doi.org/10.1177/153537020222701113>.

- Huber, Florian, Adeline Boire, Magdalena Preciado López, et Gijse H. Koenderink. 2015. « Cytoskeletal Crosstalk: When Three Different Personalities Team Up ». *Current Opinion in Cell Biology* 32 (février): 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.10.005>.
- Hunter, T. 2000. « Signaling--2000 and Beyond ». *Cell* 100 (1): 113-27. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81688-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81688-8).
- Hyder, Claire L., Kimmo O. Isoniemi, Elin S. Torvaldson, et John E. Eriksson. 2011. « Insights into Intermediate Filament Regulation from Development to Ageing ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 9): 1363-72. <https://doi.org/10.1242/jcs.041244>.

I

- Inada, H., H. Goto, K. Tanabe, Y. Nishi, K. Kaibuchi, et M. Inagaki. 1998. « Rho-Associated Kinase Phosphorylates Desmin, the Myogenic Intermediate Filament Protein, at Unique Amino-Terminal Sites ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253 (1): 21-25. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9732>.
- Inada, H., H. Togashi, Y. Nakamura, K. Kaibuchi, K. Nagata, et M. Inagaki. 1999. « Balance between Activities of Rho Kinase and Type 1 Protein Phosphatase Modulates Turnover of Phosphorylation and Dynamics of Desmin/Vimentin Filaments ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (49): 34932-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34932>.
- Inagaki, M., Y. Gonda, M. Matsuyama, K. Nishizawa, Y. Nishi, et C. Sato. 1988. « Intermediate Filament Reconstitution in Vitro. The Role of Phosphorylation on the Assembly-Disassembly of Desmin ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (12): 5970-78.
- Inagaki, M., Y. Nishi, K. Nishizawa, M. Matsuyama, et C. Sato. 1987. « Site-Specific Phosphorylation Induces Disassembly of Vimentin Filaments in Vitro ». *Nature* 328 (6131): 649-52. <https://doi.org/10.1038/328649a0>.
- Inagaki, Natsuko, Takeharu Hayashi, Takuro Arimura, Yoshinori Koga, Megumi Takahashi, Hiroki Shibata, Kunihiko Teraoka, Taishiro Chikamori, Akira Yamashina, et Akinori Kimura. 2006. « Alpha B-Crystallin Mutation in Dilated Cardiomyopathy ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342 (2): 379-86. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.154>.
- Issad, T., E. Masson, et P. Pagesy. 2010. « O-GlcNAc Modification, Insulin Signaling and Diabetic Complications ». *Diabetes & Metabolism* 36 (6 Pt 1): 423-35. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2010.09.001>.
- Itkonen, Harri M., Massimo Loda, et Ian G. Mills. 2021. « O-GlcNAc Transferase - An Auxiliary Factor or a Full-Blown Oncogene? » *Molecular Cancer Research: MCR* 19 (4): 555-64. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0926>.
- Ito, H., K. Okamoto, H. Nakayama, T. Isobe, et K. Kato. 1997. « Phosphorylation of AlphaB-Crystallin in Response to Various Types of Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (47): 29934-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29934>.
- Izant, J. G., et E. Lazarides. 1977. « Invariance and Heterogeneity in the Major Structural and Regulatory Proteins of Chick Muscle Cells Revealed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (4): 1450-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.4.1450>.

J

- Jacko, Daniel, Käthe Bersiner, Oliver Schulz, Axel Przyklenk, Fabian Spahiu, Jörg Höhfeld, Wilhelm Bloch, et Sebastian Gehlert. 2020. « Coordinated Alpha-Crystallin B Phosphorylation and Desmin Expression Indicate Adaptation and Deadaptation to Resistance Exercise-Induced Loading in Human Skeletal Muscle ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 319 (2): C300-312. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00087.2020>.
- Jalan-Sakrikar, Nidhi, Ryan K. Bartlett, Anthony J. Baucum, et Roger J. Colbran. 2012. « Substrate-Selective and Calcium-Independent Activation of CaMKII by α -Actinin ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 15275-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.351817>.

- Jaldin-Fincati, Javier R., Martin Pavarotti, Scott Frendo-Cumbo, Philip J. Bilan, et Amira Klip. 2017. « Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 28 (8): 597-611. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.002>.
- Janué, Anna, Maria Antonia Odena, Eliandre Oliveira, Montse Olivé, et Isidro Ferrer. 2007. « Desmin Is Oxidized and Nitrated in Affected Muscles in Myotilinopathies and Desminopathies ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66 (8): 711-23. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181256b4c>.
- Janué, Anna, Montse Olivé, et Isidro Ferrer. 2007. « Oxidative Stress in Desminopathies and Myotilinopathies: A Link between Oxidative Damage and Abnormal Protein Aggregation ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 17 (4): 377-88. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00087.x>.
- Ji, Suená, Jeong Gu Kang, Sang Yoon Park, Joohun Lee, Young J. Oh, et Jin Won Cho. 2011. « O-GlcNAcylation of Tubulin Inhibits Its Polymerization ». *Amino Acids* 40 (3): 809-18. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0698-9>.
- Jiao, Wangwang, Mengding Qian, Pulin Li, Lei Zhao, et Zengyi Chang. 2005. « The Essential Role of the Flexible Termini in the Temperature-Responsiveness of the Oligomeric State and Chaperone-like Activity for the Polydisperse Small Heat Shock Protein IbpB from *Escherichia Coli* ». *Journal of Molecular Biology* 347 (4): 871-84. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.029>.
- Jiménez-Castillo, Victoria, Daniela Illescas-Barbosa, Edgar Zenteno, Beatriz Xóchitl Ávila-Curiel, Maria Cristina Castañeda-Patlán, Martha Robles-Flores, Daniel Montante-Montes De Oca, et al. 2022. « Increased O-GlcNAcylation Promotes IGF-1 Receptor/Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway in Cervical Cancer Cells ». *Scientific Reports* 12 (1): 4464. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08445-0>.
- Jin, J.-K., R. Whittaker, M. S. Glassy, S. B. Barlow, R. A. Gottlieb, et C. C. Glembotski. 2008. « Localization of Phosphorylated AlphaB-Crystallin to Heart Mitochondria during Ischemia-Reperfusion ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (1): H337-344. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00881.2007>.
- Jínek, Martin, Jan Rehwinkel, Brooke D. Lazarus, Elisa Izaurrealde, John A. Hanover, et Elena Conti. 2004. « The Superhelical TPR-Repeat Domain of O-Linked GlcNAc Transferase Exhibits Structural Similarities to Importin Alpha ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10): 1001-7. <https://doi.org/10.1038/nsmb833>.
- Joanne, Pierre, Oussama Chourbagi, Christophe Hourdé, Arnaud Ferry, Gillian Butler-Browne, Patrick Vicart, Julie Dumonceaux, et Onnik Agbulut. 2013. « Viral-Mediated Expression of Desmin Mutants to Create Mouse Models of Myofibrillar Myopathy ». *Skeletal Muscle* 3 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-3-4>.
- Jochmann, Ramona, Patrick Holz, Heinrich Sticht, et Michael Stürzl. 2014. « Validation of the Reliability of Computational O-GlcNAc Prediction ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1844 (2): 416-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.002>.
- Johnson, L. N., et R. J. Lewis. 2001. « Structural Basis for Control by Phosphorylation ». *Chemical Reviews* 101 (8): 2209-42. <https://doi.org/10.1021/cr000225s>.
- Julka, Samir, et Fred Regnier. 2004. « Quantification in Proteomics through Stable Isotope Coding: A Review ». *Journal of Proteome Research* 3 (3): 350-63. <https://doi.org/10.1021/pr0340734>.

K

- Kaasik, Krista, Saul Kivimäe, Jasmina J. Allen, Robert J. Chalkley, Yong Huang, Kristin Baer, Holger Kissel, et al. 2013. « Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock ». *Cell Metabolism* 17 (2): 291-302. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.017>.
- Kachinsky, A. M., J. A. Dominov, et J. B. Miller. 1994. « Myogenesis and the Intermediate Filament Protein, Nestin ». *Developmental Biology* 165 (1): 216-28. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1248>.
- Kamada, Rui, Fuki Kudoh, Shogo Ito, Itsumi Tani, Jose Isagani B. Janairo, James G. Omichinski, et Kazuyasu Sakaguchi. 2020. « Metal-Dependent Ser/Thr Protein Phosphatase PPM Family: Evolution, Structures, Diseases and Inhibitors ». *Pharmacology & Therapeutics* 215 (novembre): 107622. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107622>.
- Kameshita, Isamu, Hiromi Baba, Yoshinori Umeda, et Noriyuki Sueyoshi. 2010. « In-Gel Protein Phosphatase Assay Using Fluorogenic Substrates ». *Analytical Biochemistry* 400 (1): 118-22. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.035>.
- Kandarian, Susan C., et Robert W. Jackman. 2006. « Intracellular Signaling during Skeletal Muscle Atrophy ». *Muscle & Nerve* 33 (2): 155-65. <https://doi.org/10.1002/mus.20442>.

- Kato, K., H. Ito, K. Kamei, Y. Inaguma, I. Iwamoto, et S. Saga. 1998. « Phosphorylation of AlphaB-Crystallin in Mitotic Cells and Identification of Enzymatic Activities Responsible for Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 28346-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28346>.
- Kawajiri, Aie, Yoshihiro Yasui, Hidemasa Goto, Masaaki Tatsuka, Masahide Takahashi, Koh-Ichi Nagata, et Masaki Inagaki. 2003. « Functional Significance of the Specific Sites Phosphorylated in Desmin at Cleavage Furrow: Aurora-B May Phosphorylate and Regulate Type III Intermediate Filaments during Cytokinesis Coordinatedly with Rho-Kinase ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (4): 1489-1500. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-09-0612>.
- Kawano, Fuminori, Ryo Fujita, Naoya Nakai, Masahiro Terada, Takashi Ohira, et Yoshinobu Ohira. 2012. « HSP25 Can Modulate Myofibrillar Desmin Cytoskeleton Following the Phosphorylation at Ser15 in Rat Soleus Muscle ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 112 (1): 176-86. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00783.2011>.
- Kebede, Melkam, Mourad Ferdaoussi, Arturo Mancini, Thierry Alquier, Rohit N. Kulkarni, Michael D. Walker, et Vincent Poitout. 2012. « Glucose Activates Free Fatty Acid Receptor 1 Gene Transcription via Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent O-GlcNAcylation of Pancreas-Duodenum Homeobox-1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (7): 2376-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114350109>.
- Khidekel, Nelly, Scott B. Ficarro, Eric C. Peters, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2004. « Exploring the O-GlcNAc Proteome: Direct Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins from the Brain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13132-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403471101>.
- Kim, Eun J. 2011. « Chemical Arsenal for the Study of O-GlcNAc ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 16 (3): 1987-2022. <https://doi.org/10.3390/molecules16031987>.
- Kim, Eun Ju, Dae Ook Kang, Dona C. Love, et John A. Hanover. 2006. « Enzymatic Characterization of O-GlcNAcase Isoforms Using a Fluorogenic GlcNAc Substrate ». *Carbohydrate Research* 341 (8): 971-82. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.004>.
- Kim, Helen, Shannon Eliuk, Jessy Deshane, Sreelatha Meleth, Todd Sanderson, Anita Pinner, Gloria Robinson, Landon Wilson, Marion Kirk, et Stephen Barnes. 2007. « 2D Gel Proteomics: An Approach to Study Age-Related Differences in Protein Abundance or Isoform Complexity in Biological Samples ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 371: 349-91. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_24.
- Kim, Sang-Min, Seungjae Zhang, Jiwon Park, Hyun Jae Sung, Thuy-Duong Thi Tran, ChiHyee Chung, et Inn-Oc Han. 2021. « REM Sleep Deprivation Impairs Learning and Memory by Decreasing Brain O-GlcNAc Cycling in Mouse ». *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 18 (4): 2504-17. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01094-7>.
- Kim, Seyun, et Pierre A. Coulombe. 2007. « Intermediate Filament Scaffolds Fulfill Mechanical, Organizational, and Signaling Functions in the Cytoplasm ». *Genes & Development* 21 (13): 1581-97. <https://doi.org/10.1101/gad.1552107>.
- Kinoshita, Eiji, Emiko Kinoshita-Kikuta, et Tohru Koike. 2009. « Separation and Detection of Large Phosphoproteins Using Phos-Tag SDS-PAGE ». *Nature Protocols* 4 (10): 1513-21. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.154>.
- Kinoshita, Eiji, Emiko Kinoshita-Kikuta, Kei Takiyama, et Tohru Koike. 2006. « Phosphate-Binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins ». *Molecular & Cellular Proteomics* 5 (4): 749-57. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500024-MCP200>.
- Kischel, P., B. Bastide, J. D. Potter, et Y. Mounier. 2000. « The Role of the Ca(2+) Regulatory Sites of Skeletal Troponin C in Modulating Muscle Fibre Reactivity to the Ca(2+) Sensitizer Bepridil ». *British Journal of Pharmacology* 131 (7): 1496-1502. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703727>.
- Kitajima, Yasuo, Kiyoshi Yoshioka, et Naoki Suzuki. 2020. « The Ubiquitin-Proteasome System in Regulation of the Skeletal Muscle Homeostasis and Atrophy: From Basic Science to Disorders ». *The Journal of Physiological Sciences: JPS* 70 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/s12576-020-00768-9>.
- Kitamura, S., S. Ando, M. Shibata, K. Tanabe, C. Sato, et M. Inagaki. 1989. « Protein Kinase C Phosphorylation of Desmin at Four Serine Residues within the Non-Alpha-Helical Head Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (10): 5674-78.
- Kneass, Zachary T., et Richard B. Marchase. 2005. « Protein O-GlcNAc Modulates Motility-Associated Signaling Intermediates in Neutrophils ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 14579-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414066200>.

- Knöll, Ralph, Byambajav Buyandelger, et Max Lab. 2011. « The Sarcomeric Z-Disc and Z-Discopathies ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011: 569628. <https://doi.org/10.1155/2011/569628>.
- Konieczny, Patryk, Peter Fuchs, Siegfried Reipert, Wolfram S. Kunz, Anikó Zeöld, Irmgard Fischer, Denise Paulin, Rolf Schröder, et Gerhard Wiche. 2008. « Myofiber Integrity Depends on Desmin Network Targeting to Z-Disks and Costameres via Distinct Plectin Isoforms ». *The Journal of Cell Biology* 181 (4): 667-81. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711058>.
- Kontrogianni-Konstantopoulos, Aikaterini, Maegen A. Ackermann, Amber L. Bowman, Solomon V. Yap, et Robert J. Bloch. 2009. « Muscle Giants: Molecular Scaffolds in Sarcomerogenesis ». *Physiological Reviews* 89 (4): 1217-67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2009>.
- Kooij, Viola, Ger J. M. Stienen, et Jolanda van der Velden. 2011. « The Role of Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of Sarcomeric Proteins in the Heart-Detrimental or Beneficial? » *Biophysical Reviews* 3 (3): 107. <https://doi.org/10.1007/s12551-011-0050-y>.
- Kore, Rajshekhar A., et Edathara C. Abraham. 2016. « Phosphorylation Negatively Regulates Exosome Mediated Secretion of CryAB in Glioma Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 (2): 368-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.027>.
- Kostareva, Anna, Gunnar Sjöberg, Joseph Bruton, Shi-Jin Zhang, Johanna Balogh, Alexandra Gudkova, Birgitta Hedberg, Lars Edström, Håkan Westerblad, et Thomas Sejersen. 2008. « Mice Expressing L345P Mutant Desmin Exhibit Morphological and Functional Changes of Skeletal and Cardiac Mitochondria ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 29 (1): 25-36. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9139-8>.
- Koutakis, Panagiotis, Dimitrios Miserlis, Sara A. Myers, Julian Kyung-Soo Kim, Zhen Zhu, Evlampia Papoutsis, Stanley A. Swanson, et al. 2015. « Abnormal Accumulation of Desmin in Gastrocnemius Myofibers of Patients with Peripheral Artery Disease: Associations with Altered Myofiber Morphology and Density, Mitochondrial Dysfunction and Impaired Limb Function ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 63 (4): 256-69. <https://doi.org/10.1369/0022155415569348>.
- Krause, Frank. 2006. « Detection and Analysis of Protein-Protein Interactions in Organellar and Prokaryotic Proteomes by Native Gel Electrophoresis: (Membrane) Protein Complexes and Supercomplexes ». *Electrophoresis* 27 (13): 2759-81. <https://doi.org/10.1002/elps.200600049>.
- Kreppel, L. K., et G. W. Hart. 1999. « Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase. Role of the Tetratricopeptide Repeats ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (45): 32015-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32015>.
- Krishnamoorthy, Vigneshwaran, Anthony J. Donofrio, et Jody L. Martin. 2013. « O-GlcNAcylation of AB-Crystallin Regulates Its Stress-Induced Translocation and Cytoprotection ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 379 (1-2): 59-68. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1627-5>.
- Kubota, Yuji, Ko Fujioka, et Mutsuhiro Takekawa. 2017. « WGA-Based Lectin Affinity Gel Electrophoresis: A Novel Method for the Detection of O-GlcNAc-Modified Proteins ». *PloS One* 12 (7): e0180714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180714>.
- Kumar, Priti, Arvindhan Nagarajan, et Pradeep D. Uchil. 2018. « Analysis of Cell Viability by the MTT Assay ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2018 (6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>.
- Kwak, Tae Kyoung, Hyeonjung Kim, Oisun Jung, Sin-Ae Lee, Minkyung Kang, Hyun Jeong Kim, Ji-Min Park, Sung-Hoon Kim, et Jung Weon Lee. 2010. « Glucosamine Treatment-Mediated O-GlcNAc Modification of Paxillin Depends on Adhesion State of Rat Insulinoma INS-1 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (46): 36021-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129601>.

L

- Laarse, Saar A. M. van der, Aneika C. Leney, et Albert J. R. Heck. 2018. « Crosstalk between Phosphorylation and O-GlcNAcylation: Friend or Foe ». *The FEBS Journal* 285 (17): 3152-67. <https://doi.org/10.1111/febs.14491>.
- Laczy, Boglarka, Susan A. Marsh, Charlye A. Brocks, Istvan Wittmann, et John C. Chatham. 2010. « Inhibition of O-GlcNAcase in perfused rat hearts by NAG-thiazolines at the time of reperfusion is cardioprotective in an O-GlcNAc-dependent manner ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 299 (5): H1715-27. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00337.2010>.

- Lairson, L. L., B. Henrissat, G. J. Davies, et S. G. Withers. 2008. « Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms ». *Annual Review of Biochemistry* 77: 521-55. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322>.
- Lambert, Matthias, Bruno Bastide, et Caroline Cieniewski-Bernard. 2018. « Involvement of O-GlcNAcylation in the Skeletal Muscle Physiology and Physiopathology: Focus on Muscle Metabolism ». *Frontiers in Endocrinology* 9: 578. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00578>.
- Lambert, Matthias, Charlotte Claeysen, Bruno Bastide, et Caroline Cieniewski-Bernard. 2019. « O-GlcNAcylation as a Regulator of the Functional and Structural Properties of the Sarcomere in Skeletal Muscle: An Update Review ». *Acta Physiologica (Oxford, England)*, mai, e13301. <https://doi.org/10.1111/apha.13301>.
- Lambert, Matthias, Elodie Richard, Sophie Duban-Deweier, Frederic Krzewinski, Barbara Deracinois, Erwan Dupont, Bruno Bastide, et Caroline Cieniewski-Bernard. 2016. « O-GlcNAcylation Is a Key Modulator of Skeletal Muscle Sarcomeric Morphometry Associated to Modulation of Protein-Protein Interactions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (9): 2017-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.011>.
- Landry, Taylor, Daniel Shookster, et Hu Huang. 2020. « Tissue-Specific Approaches Reveal Diverse Metabolic Functions of Rho-Kinase 1 ». *Frontiers in Endocrinology* 11: 622581. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.622581>.
- Langer, Henning T., Agata A. Mossakowski, Brandon J. Willis, Kristin N. Grimsrud, Joshua A. Wood, Kevin C. K. Lloyd, Hermann Zbinden-Foncea, et Keith Baar. 2020. « Generation of Desminopathy in Rats Using CRISPR-Cas9 ». *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 11 (5): 1364-76. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12619>.
- Launay, Nathalie, Bertrand Goudeau, Kanefusa Kato, Patrick Vicart, et Alain Lilienbaum. 2006. « Cell Signaling Pathways to AlphaB-Crystallin Following Stresses of the Cytoskeleton ». *Experimental Cell Research* 312 (18): 3570-84. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.07.025>.
- Lazarides, E. 1980. « Intermediate Filaments as Mechanical Integrators of Cellular Space ». *Nature* 283 (5744): 249-56. <https://doi.org/10.1038/283249a0>.
- Lazarides, E. 1982. « Intermediate Filaments: A Chemically Heterogeneous, Developmentally Regulated Class of Proteins ». *Annual Review of Biochemistry* 51: 219-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.001251>.
- Lazarides, E., et B. D. Hubbard. 1976. « Immunological Characterization of the Subunit of the 100 A Filaments from Muscle Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (12): 4344-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.12.4344>.
- Lazarus, Michael B., Jiaoyang Jiang, Vaibhav Kapuria, Tanja Bhuiyan, John Janetzko, Wesley F. Zandberg, David J. Vocadlo, Winship Herr, et Suzanne Walker. 2013. « HCF-1 Is Cleaved in the Active Site of O-GlcNAc Transferase ». *Science (New York, N.Y.)* 342 (6163): 1235-39. <https://doi.org/10.1126/science.1243990>.
- Lazarus, Michael B., Yunsun Nam, Jiaoyang Jiang, Piotr Sliz, et Suzanne Walker. 2011. « Structure of Human O-GlcNAc Transferase and Its Complex with a Peptide Substrate ». *Nature* 469 (7331): 564-67. <https://doi.org/10.1038/nature09638>.
- Lee, A. D., P. A. Hansen, et J. O. Holloszy. 1995. « Wortmannin Inhibits Insulin-Stimulated but Not Contraction-Stimulated Glucose Transport Activity in Skeletal Muscle ». *FEBS Letters* 361 (1): 51-54. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00147-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00147-2).
- Lee, Byeong Eun, Pann-Ghill Suh, et Jae-Ick Kim. 2021. « O-GlcNAcylation in Health and Neurodegenerative Diseases ». *Experimental & Molecular Medicine* 53 (11): 1674-82. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00709-5>.
- Lee, Pey Yee, Neda Saraygord-Afshari, et Teck Yew Low. 2020. « The Evolution of Two-Dimensional Gel Electrophoresis - from Proteomics to Emerging Alternative Applications ». *Journal of Chromatography. A* 1615 (mars): 460763. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460763>.
- Lefebvre, T., C. Alonso, S. Mahboub, M. J. Dupire, J. P. Zanetta, M. L. Caillet-Boudin, et J. C. Michalski. 1999. « Effect of Okadaic Acid on O-Linked N-Acetylglucosamine Levels in a Neuroblastoma Cell Line ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1472 (1-2): 71-81. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(99\)00105-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(99)00105-1).
- Lehman, Donna M., Dong-Jing Fu, Angela B. Freeman, Kelly J. Hunt, Robin J. Leach, Teresa Johnson-Pais, Jeanette Hamlington, et al. 2005. « A Single Nucleotide Polymorphism in MGEA5 Encoding O-GlcNAc-Selective N-Acetyl-Beta-D Glucosaminidase Is Associated with Type 2 Diabetes in Mexican Americans ». *Diabetes* 54 (4): 1214-21. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.1214>.
- Leung, Man-Ching, Paul G. Hitchen, Douglas G. Ward, Andrew E. Messer, et Steven B. Marston. 2013. « Z-Band Alternatively Spliced PDZ Motif Protein (ZASP) Is the Major O-Linked β -N-Acetylglucosamine-Substituted

- Protein in Human Heart Myofibrils ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4891-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410316>.
- Levene P.A. and Alsberg C.L. 1906. "The cleavage products of vitellin". *Journal of Biology Chemistry* 2: 127-133 [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46054-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46054-6)
- Li, D., T. Tapscoft, O. Gonzalez, P. E. Burch, M. A. Quiñones, W. A. Zoghbi, R. Hill, L. L. Bachinski, D. L. Mann, et R. Roberts. 1999. « Desmin Mutation Responsible for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation* 100 (5): 461-64. <https://doi.org/10.1161/01.cir.100.5.461>.
- Li, H., et Y. Capetanaki. 1993. « Regulation of the Mouse Desmin Gene: Transactivated by MyoD, Myogenin, MRF4 and Myf5 ». *Nucleic Acids Research* 21 (2): 335-43. <https://doi.org/10.1093/nar/21.2.335>.
- Li, Mei, Monika Andersson-Lendahl, Thomas Sejersen, et Anders Arner. 2013. « Knockdown of Desmin in Zebrafish Larvae Affects Interfilament Spacing and Mechanical Properties of Skeletal Muscle ». *The Journal of General Physiology* 141 (3): 335-45. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210915>.
- Li, Yong, Patrick Lang, et Wolfgang A. Linke. 2016. « Titin Stiffness Modifies the Force-Generating Region of Muscle Sarcomeres ». *Scientific Reports* 6 (avril): 24492. <https://doi.org/10.1038/srep24492>.
- Li, Z., M. Mericskay, O. Agbulut, G. Butler-Browne, L. Carlsson, L. E. Thornell, C. Babinet, et D. Paulin. 1997. « Desmin Is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 139 (1): 129-44. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.129>.
- Liao, Lujian, Daniel B. McClatchy, Sung Kyu Park, Tao Xu, Bingwen Lu, et John R. Yates. 2008. « Quantitative Analysis of Brain Nuclear Phosphoproteins Identifies Developmentally Regulated Phosphorylation Events ». *Journal of Proteome Research* 7 (11): 4743-55. <https://doi.org/10.1021/pr8003198>.
- Lima, Victor V., Christin e S. Rigsby, David M. Hardy, R. Clinton Webb, et Rita C. Tostes. 2009. « O-GlcNAcylation: A Novel Post-Translational Mechanism to Alter Vascular Cellular Signaling in Health and Disease: Focus on Hypertension ». *Journal of the American Society of Hypertension: JASH* 3 (6): 374-87. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2009.09.004>.
- Liu, Jia, Richard B. Marchase, et John C. Chatham. 2007. « Glutamine-Induced Protection of Isolated Rat Heart from Ischemia/Reperfusion Injury Is Mediated via the Hexosamine Biosynthesis Pathway and Increased Protein O-GlcNAc Levels ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42 (1): 177-85. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.09.015>.
- Liu, Li, Ling Li, Cheng Ma, Yangde Shi, Congcong Liu, Zikang Xiao, Yong Zhang, et al. 2019. « O-GlcNAcylation of Thr12/Ser56 in Short-Form O-GlcNAc Transferase (SOGT) Regulates Its Substrate Selectivity ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (45): 16620-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009085>.
- Liu, Yang, Ya-Jie Hu, Wen-Xuan Fan, Xin Quan, Bin Xu, et Shi-Ze Li. 2022. « O-GlcNAcylation: The Underestimated Emerging Regulators of Skeletal Muscle Physiology ». *Cells* 11 (11): 1789. <https://doi.org/10.3390/cells11111789>.
- Lodka, D orte, Aanchal Pahuja, Cornelia Geers-Kn orr, Renate J. Scheibe, Marcel Nowak, Jida Hamati, Clemens K ohncke, et al. 2016. « Muscle RING-Finger 2 and 3 Maintain Striated-Muscle Structure and Function ». *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 7 (2): 165-80. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12057>.
- Loh, S. H., W. T. Chan, Z. Gong, T. M. Lim, et K. L. Chua. 2000. « Characterization of a Zebrafish (Danio Rerio) Desmin cDNA: An Early Molecular Marker of Myogenesis ». *Differentiation; Research in Biological Diversity* 65 (5): 247-54. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2000.6550247.x>.
- Love, Dona C., et John A. Hanover. 2005. « The Hexosamine Signaling Pathway: Deciphering the "O-GlcNAc Code" ». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2005 (312): re13. <https://doi.org/10.1126/stke.3122005re13>.
- Lowery, Jason, Edward R. Kuczmarski, Harald Herrmann, et Robert D. Goldman. 2015. « Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (28): 17145-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.640359>.
- Lu, Cheng-Tsung, Kai-Yao Huang, Min-Gang Su, Tzong-Yi Lee, Neil Arvin Breta na, Wen-Chi Chang, Yi-Ju Chen, Yu-Ju Chen, et Hsien-Da Huang. 2013. « DbPTM 3.0: An Informative Resource for Investigating Substrate Site Specificity and Functional Association of Protein Post-Translational Modifications ». *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue): D295-305. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1229>.
- Lubas, W. A., et J. A. Hanover. 2000. « Functional Expression of O-Linked GlcNAc Transferase. Domain Structure and Substrate Specificity ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (15): 10983-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10983>.

M

- Ma, Junfeng, Partha Banerjee, Stephen A. Whelan, Ting Liu, An-Chi Wei, Genaro Ramirez-Correa, Mark E. McComb, et al. 2016. « Comparative Proteomics Reveals Dysregulated Mitochondrial O-GlcNAcylation in Diabetic Hearts ». *Journal of Proteome Research* 15 (7): 2254-64. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00250>.
- Ma, Junfeng, et Gerald W. Hart. 2013. « Protein O-GlcNAcylation in Diabetes and Diabetic Complications ». *Expert Review of Proteomics* 10 (4): 365-80. <https://doi.org/10.1586/14789450.2013.820536>.
- Ma, Junfeng, et Gerald W. Hart. 2014. « O-GlcNAc Profiling: From Proteins to Proteomes ». *Clinical Proteomics* 11 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-8>.
- Ma, Junfeng, Chunyan Hou, et Ci Wu. 2022. « Demystifying the O-GlcNAc Code: A Systems View ». *Chemical Reviews*, mars. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01006>.
- Mado, Kati, Vladimir Chekulayev, Igor Shevchuk, Marju Puurand, Kersti Tepp, et Tuuli Kaambre. 2019. « On the Role of Tubulin, Plectin, Desmin, and Vimentin in the Regulation of Mitochondrial Energy Fluxes in Muscle Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 316 (5): C657-67. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2018>.
- Maerkens, A., R. A. Kley, M. Olivé, V. Theis, P. F. M. van der Ven, J. Reimann, H. Milting, et al. 2013. « Differential Proteomic Analysis of Abnormal Intramyoplasmic Aggregates in Desminopathy ». *Journal of Proteomics* 90 (septembre): 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.026>.
- Makihara, Hiroyuki, Hironori Inaba, Atsushi Enomoto, Hiroki Tanaka, Yasuko Tomono, Kaori Ushida, Mitsuo Goto, et al. 2016. « Desmin Phosphorylation by Cdk1 Is Required for Efficient Separation of Desmin Intermediate Filaments in Mitosis and Detected in Murine Embryonic/Newborn Muscle and Human Rhabdomyosarcoma Tissues ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (3): 1323-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.122>.
- Mamczur, Piotr, Dariusz Rakus, Agnieszka Gizak, Danuta Dus, et Andrzej Dzugaj. 2005. « The Effect of Calcium Ions on Subcellular Localization of Aldolase-FBPase Complex in Skeletal Muscle ». *FEBS Letters* 579 (7): 1607-12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.071>.
- Massaccesi, Luca, Giancarlo Goi, Cristina Tringali, Alessandra Barassi, Bruno Venerando, et Nadia Papini. 2016. « Dexamethasone-Induced Skeletal Muscle Atrophy Increases O-GlcNAcylation in C2C12 Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 117 (8): 1833-42. <https://doi.org/10.1002/jcb.25483>.
- Matthews, Jason A., Mildred Acevedo-Duncan, et Robert L. Potter. 2005. « Selective Decrease of Membrane-Associated PKC-Alpha and PKC-Epsilon in Response to Elevated Intracellular O-GlcNAc Levels in Transformed Human Glial Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1743 (3): 305-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.11.001>.
- Mauri, Theo, Laurence Menu-Bouaouiche, Muriel Bardor, Tony Lefebvre, Marc F Lensink, et Guillaume Brysbaert. 2021. « O-GlcNAcylation Prediction: An Unattained Objective ». *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC* 14 (juin): 87-102. <https://doi.org/10.2147/AABC.S294867>.
- McElhinny, Abigail S., Cynthia N. Perry, Christian C. Witt, Siegfried Labeit, et Carol C. Gregorio. 2004. « Muscle-Specific RING Finger-2 (MURF-2) Is Important for Microtubule, Intermediate Filament and Sarcomeric M-Line Maintenance in Striated Muscle Development ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 15): 3175-88. <https://doi.org/10.1242/jcs.01158>.
- Megger, Dominik A., Thilo Bracht, Helmut E. Meyer, et Barbara Sitek. 2013. « Label-Free Quantification in Clinical Proteomics ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1834 (8): 1581-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.04.001>.
- Mehdy, Ali, Willy Morelle, Claire Rosnoblet, Dominique Legrand, Tony Lefebvre, Sandrine Duvet, et François Foulquier. 2012. « PUGNAc Treatment Leads to an Unusual Accumulation of Free Oligosaccharides in CHO Cells ». *Journal of Biochemistry* 151 (4): 439-46. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs012>.
- Mercier, Thomas, Marion Bouvet, Emilie Dubois-Deruy, Arthur Dechaumes, Olivia Beseme, Vincent Richard, Paul Mulder, et Florence Pinet. 2018. « Interplay Between Phosphorylation and O-GlcNAcylation of Sarcomeric Proteins in Ischemic Heart Failure ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00598>.
- Merz, Karla E., et Debbie C. Thurmond. 2020. « Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake ». *Comprehensive Physiology* 10 (3): 785-809. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190029>.
- Millman, B. M. 1998. « The Filament Lattice of Striated Muscle ». *Physiological Reviews* 78 (2): 359-91. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.359>.

- Milner, D. J., G. E. Taffet, X. Wang, T. Pham, T. Tamura, C. Hartley, A. M. Gerdes, et Y. Capetanaki. 1999. « The Absence of Desmin Leads to Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Dilation with Compromised Systolic Function ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31 (11): 2063-76. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1037>.
- Milner, D. J., G. Weitzer, D. Tran, A. Bradley, et Y. Capetanaki. 1996. « Disruption of Muscle Architecture and Myocardial Degeneration in Mice Lacking Desmin ». *The Journal of Cell Biology* 134 (5): 1255-70. <https://doi.org/10.1083/jcb.134.5.1255>.
- Minguez, Pablo, Luca Parca, Francesca Diella, Daniel R. Mende, Runjun Kumar, Manuela Helmer-Citterich, Anne-Claude Gavin, Vera van Noort, et Peer Bork. 2012. « Deciphering a Global Network of Functionally Associated Post-Translational Modifications ». *Molecular Systems Biology* 8 (juillet): 599. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.31>.
- Mirzoev, Timur M., Kristina A. Sharlo, et Boris S. Shenkman. 2021. « The Role of GSK-3 β in the Regulation of Protein Turnover, Myosin Phenotype, and Oxidative Capacity in Skeletal Muscle under Disuse Conditions ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (10): 5081. <https://doi.org/10.3390/ijms22105081>.
- Mishra, Sanjay, Shane A. Chandler, Dewight Williams, Derek P. Claxton, Hanane A. Koteiche, Phoebe L. Stewart, Justin L. P. Benesch, et Hassane S. Mchaourab. 2018. « Engineering of a Polydisperse Small Heat-Shock Protein Reveals Conserved Motifs of Oligomer Plasticity ». *Structure (London, England: 1993)* 26 (8): 1116-1126.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.05.015>.
- Mitsui, T., M. Kawajiri, M. Kunishige, T. Endo, M. Akaike, K. Aki, et T. Matsumoto. 2000. « Functional Association between Nicotinic Acetylcholine Receptor and Sarcomeric Proteins via Actin and Desmin Filaments ». *Journal of Cellular Biochemistry* 77 (4): 584-95. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(20000615\)77:4<584::aid-jcb6>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(20000615)77:4<584::aid-jcb6>3.0.co;2-u).
- Mueller, Toni, Xiaosen Ouyang, Michelle S. Johnson, Wei-Jun Qian, John C. Chatham, Victor Darley-Usmar, et Jianhua Zhang. 2020. « New Insights Into the Biology of Protein O-GlcNAcylation: Approaches and Observations ». *Frontiers in Aging* 1: 620382. <https://doi.org/10.3389/fragi.2020.620382>.
- Murata, Koichiro, Katsutaro Morino, Shogo Ida, Natsuko Ohashi, Mengistu Lemecha, Shi-Young Park, Atsushi Ishikado, et al. 2018. « Lack of O-GlcNAcylation Enhances Exercise-Dependent Glucose Utilization Potentially through AMP-Activated Protein Kinase Activation in Skeletal Muscle ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (2): 2098-2104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.081>.
- Myers, Samuel A., Sailaja Peddada, Nilanjana Chatterjee, Tara Friedrich, Kiichiro Tomoda, Gregor Krings, Sean Thomas, et al. 2016. « SOX2 O-GlcNAcylation Alters Its Protein-Protein Interactions and Genomic Occupancy to Modulate Gene Expression in Pluripotent Cells ». *ELife* 5 (mars): e10647. <https://doi.org/10.7554/eLife.10647>.

N

- Nagata, K., I. Izawa, et M. Inagaki. 2001. « A Decade of Site- and Phosphorylation State-Specific Antibodies: Recent Advances in Studies of Spatiotemporal Protein Phosphorylation ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 6 (8): 653-64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00454.x>.
- Nagel, Alexis K., et Lauren E. Ball. 2014. « O-GlcNAc Transferase and O-GlcNAcase: Achieving Target Substrate Specificity ». *Amino Acids* 46 (10): 2305-16. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1827-7>.
- Nakamura, Seika, Satoshi Nakano, Makoto Nishii, Satoshi Kaneko, et Hirofumi Kusaka. 2012. « Localization of O-GlcNAc-Modified Proteins in Neuromuscular Diseases ». *Medical Molecular Morphology* 45 (2): 86-90. <https://doi.org/10.1007/s00795-011-0542-7>.
- Nakano, S., A. G. Engel, I. Akiguchi, et J. Kimura. 1997. « Myofibrillar Myopathy. III. Abnormal Expression of Cyclin-Dependent Kinases and Nuclear Proteins ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56 (8): 850-56. <https://doi.org/10.1097/00005072-199708000-00002>.
- Nandelstadh, Pernilla von, Mohamed Ismail, Chiara Gardin, Heli Suila, Ivano Zara, Anna Belgrano, Giorgio Valle, Olli Carpen, et Georgine Faulkner. 2009. « A Class III PDZ Binding Motif in the Myotilin and FAT2 Families Binds Enigma Family Proteins: A Common Link for Z-Disc Myopathies ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (3): 822-34. <https://doi.org/10.1128/MCB.01454-08>.
- Nandi, Dipankar, Pankaj Tahiliani, Anujith Kumar, et Dilip Chandu. 2006. « The Ubiquitin-Proteasome System ». *Journal of Biosciences* 31 (1): 137-55. <https://doi.org/10.1007/BF02705243>.

- Nevezorov, I. A., et D. I. Levitsky. 2011. « Tropomyosin: Double Helix from the Protein World ». *Biochemistry. Biokhimiia* 76 (13): 1507-27. <https://doi.org/10.1134/S0006297911130098>.
- Nicholl, I. D., et R. A. Quinlan. 1994. « Chaperone Activity of Alpha-Crystallins Modulates Intermediate Filament Assembly ». *The EMBO Journal* 13 (4): 945-53.
- Nie, Hao, et Wen Yi. 2019. « O-GlcNAcylation, a Sweet Link to the Pathology of Diseases ». *Journal of Zhejiang University. Science. B* 20 (5): 437-48. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900150>.
- Nishi, Hafumi, Alexey Shaytan, et Anna R. Panchenko. 2014. « Physicochemical Mechanisms of Protein Regulation by Phosphorylation ». *Frontiers in Genetics* 5: 270. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00270>.
- Nishimura, Yuhei, Kousuke Kasahara, et Masaki Inagaki. 2019. « Intermediate Filaments and IF-Associated Proteins: From Cell Architecture to Cell Proliferation ». *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 95 (8): 479-93. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.034>.

O

- Obermann, W. M., M. Gautel, K. Weber, et D. O. Fürst. 1997. « Molecular Structure of the Sarcomeric M Band: Mapping of Titin and Myosin Binding Domains in Myomesin and the Identification of a Potential Regulatory Phosphorylation Site in Myomesin ». *The EMBO Journal* 16 (2): 211-20. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.2.211>.
- O'Connor, C. M., D. R. Balzer, et E. Lazarides. 1979. « Phosphorylation of Subunit Proteins of Intermediate Filaments from Chicken Muscle and Nonmuscle Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (2): 819-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.819>.
- O'Donnell, Niall, Natasha E. Zachara, Gerald W. Hart, et Jamey D. Marth. 2004. « Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (4): 1680-90. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1680-1690.2004>.
- Ogawa, Mitsutaka, Hidenori Mizofuchi, Yuki Kobayashi, Genta Tsuzuki, Mayumi Yamamoto, Shuichi Wada, et Kazuo Kamemura. 2012. « Terminal Differentiation Program of Skeletal Myogenesis Is Negatively Regulated by O-GlcNAc Glycosylation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1820 (1): 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.011>.
- Ogawa, Mitsutaka, Yuki Sakakibara, et Kazuo Kamemura. 2013. « Requirement of Decreased O-GlcNAc Glycosylation of Mef2D for Its Recruitment to the Myogenin Promoter ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 433 (4): 558-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.033>.
- Ohtakara, K., H. Inada, H. Goto, W. Taki, E. Manser, L. Lim, I. Izawa, et M. Inagaki. 2000. « P21-Activated Kinase PAK Phosphorylates Desmin at Sites Different from Those for Rho-Associated Kinase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272 (3): 712-16. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2854>.
- Ojuka, Edward O., Veeraj Goyaram, et James A. H. Smith. 2012. « The Role of CaMKII in Regulating GLUT4 Expression in Skeletal Muscle ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 303 (3): E322-331. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00091.2012>.
- Olivé, Montse, Judith Armstrong, Francesc Miralles, Adolf Pou, Michel Fardeau, Laura Gonzalez, Francesca Martínez, et al. 2007. « Phenotypic Patterns of Desminopathy Associated with Three Novel Mutations in the Desmin Gene ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 17 (6): 443-50. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.02.009>.
- Olivé, Montse, Lev Goldfarb, Dolores Moreno, Encarna Laforet, Ayush Dagvadorj, Nyamkhishig Sambuughin, Juan Antonio Martínez-Matos, et al. 2004. « Desmin-Related Myopathy: Clinical, Electrophysiological, Radiological, Neuropathological and Genetic Studies ». *Journal of the Neurological Sciences* 219 (1-2): 125-37. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.01.007>.
- Olivé, Montse, Zaga Odgerel, Amaia Martínez, Juan José Poza, Federico García Bragado, Ramón J. Zabalza, Ivonne Jericó, et al. 2011. « Clinical and Myopathological Evaluation of Early- and Late-Onset Subtypes of Myofibrillar Myopathy ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 21 (8): 533-42. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.05.002>.
- Olivier-Van Stichelen, Stéphanie, Vanessa Dehennaut, Armelle Buzy, Jean-Luc Zachayus, Céline Guinez, Anne-Marie Mir, Ikram El Yazidi-Belkoura, et al. 2014. « O-GlcNAcylation Stabilizes β -Catenin through Direct Competition with Phosphorylation at Threonine 41 ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (8): 3325-38. <https://doi.org/10.1096/fj.13-243535>.

- Omary, M. Bishr. 2009. « "IF-Pathies": A Broad Spectrum of Intermediate Filament-Associated Diseases ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1756-62. <https://doi.org/10.1172/JCI39894>.
- Omary, M. Bishr, Nam-On Ku, Guo-Zhong Tao, Diana M. Toivola, et Jian Liao. 2006. « "Heads and Tails" of Intermediate Filament Phosphorylation: Multiple Sites and Functional Insights ». *Trends in Biochemical Sciences* 31 (7): 383-94. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.008>.
- Ong, Qunxiang, Weiping Han, et Xiaoyong Yang. 2018. « O-GlcNAc as an Integrator of Signaling Pathways ». *Frontiers in Endocrinology* 9: 599. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00599>.
- Ong, Shao-En, Blagoy Blagoev, Irina Kratchmarova, Dan Bach Kristensen, Hanno Steen, Akhilesh Pandey, et Matthias Mann. 2002. « Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 1 (5): 376-86. <https://doi.org/10.1074/mcp.m200025-mcp200>.

P

- Pallari, Hanna-Mari, et John E. Eriksson. 2006. « Intermediate Filaments as Signaling Platforms ». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2006 (366): pe53. <https://doi.org/10.1126/stke.3662006pe53>.
- Pagan, Julia, Tiffany Seto, Michele Pagano, et Antonio Cittadini. 2013. « Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Heart ». *Circulation Research* 112 (7): 1046-58. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300521>.
- Parker, Matthew P., Kenneth R. Peterson, et Chad Slawson. 2021. « O-GlcNAcylation and O-GlcNAc Cycling Regulate Gene Transcription: Emerging Roles in Cancer ». *Cancers* 13 (7): 1666. <https://doi.org/10.3390/cancers13071666>.
- Patwardhan, Parag, et W. Todd Miller. 2007. « Processive Phosphorylation: Mechanism and Biological Importance ». *Cellular Signalling* 19 (11): 2218-26. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.06.006>.
- Paulin, Denise, Alexis Huet, Luiza Khanamyrian, et Zhigang Xue. 2004. « Desminopathies in Muscle Disease ». *The Journal of Pathology* 204 (4): 418-27. <https://doi.org/10.1002/path.1639>.
- Paulin, Denise, et Zhenlin Li. 2004. « Desmin: A Major Intermediate Filament Protein Essential for the Structural Integrity and Function of Muscle ». *Experimental Cell Research* 301 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.004>.
- Pearlstone, J. R., et L. B. Smillie. 1977. « The Binding Site of Skeletal Alpha-Tropomyosin on Troponin-T ». *Canadian Journal of Biochemistry* 55 (10): 1032-38. <https://doi.org/10.1139/o77-154>.
- Perng, Ming Der, Shu Fang Wen, Paul van den IJssel, Alan R. Prescott, et Roy A. Quinlan. 2004. « Desmin Aggregate Formation by R120G AlphaB-Crystallin Is Caused by Altered Filament Interactions and Is Dependent upon Network Status in Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (5): 2335-46. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0893>.
- Perng, Ming-Der, Yu-Shan Huang, et Roy A. Quinlan. 2016. « Purification of Protein Chaperones and Their Functional Assays with Intermediate Filaments ». *Methods in Enzymology* 569: 155-75. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.07.025>.
- Petersen, Kitt F., et Gerald I. Shulman. 2002. « Pathogenesis of Skeletal Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus ». *The American Journal of Cardiology* 90 (5A): 11G-18G. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(02\)02554-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(02)02554-7).
- Portbury, Andrea L., Monte S. Willis, et Cam Patterson. 2011. « Tearin' up My Heart: Proteolysis in the Cardiac Sarcomere ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (12): 9929-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.170571>.
- Prabakaran, Sudhakaran, Guy Lippens, Hanno Steen, et Jeremy Gunawardena. 2012. « Post-Translational Modification: Nature's Escape from Genetic Imprisonment and the Basis for Dynamic Information Encoding ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 4 (6): 565-83. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1185>.
- Price, M. G. 1984. « Molecular Analysis of Intermediate Filament Cytoskeleton--a Putative Load-Bearing Structure ». *The American Journal of Physiology* 246 (4 Pt 2): H566-572. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1984.246.4.H566>.
- Protonotarios, Alexandros, Andreas Brodehl, Angeliki Asimaki, Joanna Jager, Ellie Quinn, Caroline Stanasiuk, Sandra Ratnavadivel, et al. 2021. « The Novel Desmin Variant p.Leu115Ile Is Associated With a Unique

Form of Biventricular Arrhythmogenic Cardiomyopathy ». *The Canadian Journal of Cardiology* 37 (6): 857-66. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.11.017>.

R

- Raats, J. M., G. Schaart, J. B. Henderik, A. van der Kemp, I. Dunia, E. L. Benedetti, F. R. Pieper, F. C. Ramaekers, et H. Bloemendal. 1996. « Muscle-Specific Expression of a Dominant Negative Desmin Mutant in Transgenic Mice ». *European Journal of Cell Biology* 71 (3): 221-36.
- Radivojac, Predrag, Peter H. Baenziger, Maricel G. Kann, Matthew E. Mort, Matthew W. Hahn, et Sean D. Mooney. 2008. « Gain and Loss of Phosphorylation Sites in Human Cancer ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 24 (16): i241-247. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn267>.
- Rainer, Peter P., Peihong Dong, Matteo Sorge, Justyna Fert-Bober, Ronald J. Holewinski, Yuchuan Wang, Catherine A. Foss, et al. 2018. « Desmin Phosphorylation Triggers Preamyloid Oligomers Formation and Myocyte Dysfunction in Acquired Heart Failure ». *Circulation Research* 122 (10): e75-83. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312082>.
- Rakus, D., P. Mamczur, A. Gizak, D. Dus, et A. Dzugaj. 2003. « Colocalization of Muscle FBPase and Muscle Aldolase on Both Sides of the Z-Line ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (2): 294-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.209>.
- Ramirez, Daniel H., Chanat Aonbangkhen, Hung-Yi Wu, Jeffrey A. Naftaly, Stephanie Tang, Timothy R. O'Meara, et Christina M. Woo. 2020. « Engineering a Proximity-Directed O-GlcNAc Transferase for Selective Protein O-GlcNAcylation in Cells ». *ACS Chemical Biology* 15 (4): 1059-66. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00074>.
- Ramirez, Daniel H., Bo Yang, Alexandria K. D'Souza, Dacheng Shen, et Christina M. Woo. 2021. « Truncation of the TPR Domain of OGT Alters Substrate and Glycosite Selection ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (30): 7385-99. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03731-8>.
- Ramirez-Correa, Genaro A., Wenhai Jin, Zihao Wang, Xin Zhong, Wei Dong Gao, Wagner B. Dias, Cecilia Vecoli, Gerald W. Hart, et Anne M. Murphy. 2008. « O-Linked GlcNAc Modification of Cardiac Myofilament Proteins: A Novel Regulator of Myocardial Contractile Function ». *Circulation Research* 103 (12): 1354-58. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184978>.
- Ramirez-Correa, Genaro A., Junfeng Ma, Chad Slawson, Quira Zeidan, Nahyr S. Lugo-Fagundo, Mingguo Xu, Xiaoxu Shen, et al. 2015. « Removal of Abnormal Myofilament O-GlcNAcylation Restores Ca²⁺ Sensitivity in Diabetic Cardiac Muscle ». *Diabetes* 64 (10): 3573-87. <https://doi.org/10.2337/db14-1107>.
- Rappaport, L., F. Contard, J. L. Samuel, C. Delcayre, F. Marotte, F. Tomè, et M. Fardeau. 1988. « Storage of Phosphorylated Desmin in a Familial Myopathy ». *FEBS Letters* 231 (2): 421-25. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80863-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80863-9).
- Rayment, I., W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Bäse, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg, et H. M. Holden. 1993. « Three-Dimensional Structure of Myosin Subfragment-1: A Molecular Motor ». *Science (New York, N.Y.)* 261 (5117): 50-58. <https://doi.org/10.1126/science.8316857>.
- Reddy, Vadde Sudhakar, Sneha Jakhotia, P. Yadagiri Reddy, et G. Bhanuprakash Reddy. 2015. « Hyperglycemia Induced Expression, Phosphorylation, and Translocation of AB-Crystallin in Rat Skeletal Muscle ». *IUBMB Life* 67 (4): 291-99. <https://doi.org/10.1002/iub.1370>.
- Reily, Colin, Tyler J. Stewart, Matthew B. Renfrow, et Jan Novak. 2019. « Glycosylation in Health and Disease ». *Nature Reviews. Nephrology* 15 (6): 346-66. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- Reimann, Jens, Wolfram S. Kunz, Stefan Vielhaber, Karin Kappes-Horn, et Rolf Schröder. 2003. « Mitochondrial Dysfunction in Myofibrillar Myopathy ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 29 (1): 45-51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00428.x>.
- Reinle, Kevin, Axel Mogk, et Bernd Bukau. 2022. « The Diverse Functions of Small Heat Shock Proteins in the Proteostasis Network ». *Journal of Molecular Biology* 434 (1): 167157. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167157>.
- Rexach, Jessica E., Claude J. Rogers, Seok-Ho Yu, Jifang Tao, Yi E. Sun, et Linda C. Hsieh-Wilson. 2010. « Quantification of O-Glycosylation Stoichiometry and Dynamics Using Resolvable Mass Tags ». *Nature Chemical Biology* 6 (9): 645-51. <https://doi.org/10.1038/nchembio.412>.
- Richter, Erik A., et Mark Hargreaves. 2013. « Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake ». *Physiological Reviews* 93 (3): 993-1017. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2012>.

- Robles-Flores, Martha, Lennon Meléndez, Wendy García, Guillermo Mendoza-Hernández, Tukiet T. Lam, Cristina Castañeda-Patlán, et Héctor González-Aguilar. 2008. « Posttranslational Modifications on Protein Kinase c Isozymes. Effects of Epinephrine and Phorbol Esters ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1783 (5): 695-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.07.011>.
- Rogers, K. R., A. Eckelt, V. Nimrich, K. P. Janssen, M. Schliwa, H. Herrmann, et W. W. Franke. 1995. « Truncation Mutagenesis of the Non-Alpha-Helical Carboxyterminal Tail Domain of Vimentin Reveals Contributions to Cellular Localization but Not to Filament Assembly ». *European Journal of Cell Biology* 66 (2): 136-50.
- Roquemore, E. P., M. R. Chevrier, R. J. Cotter, et G. W. Hart. 1996. « Dynamic O-GlcNAcylation of the Small Heat Shock Protein Alpha B-Crystallin ». *Biochemistry* 35 (11): 3578-86. <https://doi.org/10.1021/bi951918j>.
- Ross, Philip L., Yulin N. Huang, Jason N. Marchese, Brian Williamson, Kenneth Parker, Stephen Hattan, Nikita Khainovski, et al. 2004. « Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces Cerevisiae* Using Amine-Reactive Isobaric Tagging Reagents ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 3 (12): 1154-69. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400129-MCP200>.
- Rotty, Jeremy D., Gerald W. Hart, et Pierre A. Coulombe. 2010. « Stressing the Role of O-GlcNAc: Linking Cell Survival to Keratin Modification ». *Nature Cell Biology* 12 (9): 847-49. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-847>.
- Ruan, Hai-Bin, Yina Ma, Sara Torres, Bichen Zhang, Colleen Feriod, Ryan M. Heck, Kevin Qian, et al. 2017. « Calcium-Dependent O-GlcNAc Signaling Drives Liver Autophagy in Adaptation to Starvation ». *Genes & Development* 31 (16): 1655-65. <https://doi.org/10.1101/gad.305441.117>.
- Ruan, Hai-Bin, Yongzhan Nie, et Xiaoyong Yang. 2013. « Regulation of Protein Degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with Ubiquitination ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 12 (12): 3489-97. <https://doi.org/10.1074/mcp.R113.029751>.
- Rüegg, Caspar, Claudia Veigel, Justin E. Molloy, Stephan Schmitz, John C. Sparrow, et Rainer H. A. Fink. 2002. « Molecular Motors: Force and Movement Generated by Single Myosin II Molecules ». *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 17 (octobre): 213-18. <https://doi.org/10.1152/nips.01389.2002>.

S

- Sadikot, Takrima, Courtney R. Hammond, et Michael B. Ferrari. 2010. « Distinct Roles for Telethonin N-versus C-Terminus in Sarcomere Assembly and Maintenance ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 239 (4): 1124-35. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22263>.
- Sanghvi-Shah, Rucha, et Gregory F. Weber. 2017. « Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5: 81. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00081>.
- Santos, J. M., S. B. Ribeiro, A. R. Gaya, H.-J. Appell, et J. A. Duarte. 2008. « Skeletal Muscle Pathways of Contraction-Enhanced Glucose Uptake ». *International Journal of Sports Medicine* 29 (10): 785-94. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1038404>.
- Sarnat, H. B. 1992. « Vimentin and Desmin in Maturing Skeletal Muscle and Developmental Myopathies ». *Neurology* 42 (8): 1616-24. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.8.1616>.
- Sarparanta, Jaakko, Per Harald Jonson, Sabita Kawan, et Bjarne Udd. 2020. « Neuromuscular Diseases Due to Chaperone Mutations: A Review and Some New Results ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (4): E1409. <https://doi.org/10.3390/ijms21041409>.
- Schiaffino, Stefano, Kenneth A. Dyar, Stefano Ciciliot, Bert Blaauw, et Marco Sandri. 2013. « Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Growth and Atrophy ». *The FEBS Journal* 280 (17): 4294-4314. <https://doi.org/10.1111/febs.12253>.
- Schimpl, Marianne, Alexander W. Schüttelkopf, Vladimir S. Borodkin, et Daan M. F. van Aalten. 2010. « Human OGA Binds Substrates in a Conserved Peptide Recognition Groove ». *The Biochemical Journal* 432 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1042/BJ20101338>.
- Schirmer, Ilona, Mareike Dieding, Bärbel Klauke, Andreas Brodehl, Anna Gaertner-Rommel, Volker Walhorn, Jan Gummert, et al. 2018. « A Novel Desmin (DES) Indel Mutation Causes Severe Atypical Cardiomyopathy in Combination with Atrioventricular Block and Skeletal Myopathy ». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 6 (2): 288-93. <https://doi.org/10.1002/mgg3.358>.

- Schjoldager, Katrine T., Yoshiki Narimatsu, Hiren J. Joshi, et Henrik Clausen. 2020. « Global View of Human Protein Glycosylation Pathways and Functions ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 21 (12): 729-49. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00294-x>.
- Schmidt, William M., William Lehman, et Jeffrey R. Moore. 2015. « Direct Observation of Tropomyosin Binding to Actin Filaments ». *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 72 (6): 292-303. <https://doi.org/10.1002/cm.21225>.
- Schnuck, Jamie K., Lacey M. Gould, Hailey A. Parry, Michele A. Johnson, Nicholas P. Gannon, Kyle L. Sunderland, et Roger A. Vaughan. 2018. « Metabolic Effects of Physiological Levels of Caffeine in Myotubes ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 74 (1): 35-45. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0601-1>.
- Schröder, Rolf, et Benedikt Schoser. 2009. « Myofibrillar Myopathies: A Clinical and Myopathological Guide ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 19 (3): 483-92. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00289.x>.
- Schröder, Rolf, Alexandra Vrabie, et Hans H. Goebel. 2007. « Primary Desminopathies ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (3): 416-26. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00057.x>.
- Schultheiss, T., Z. X. Lin, H. Ishikawa, I. Zamir, C. J. Stoeckert, et H. Holtzer. 1991. « Desmin/Vimentin Intermediate Filaments Are Dispensable for Many Aspects of Myogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 114 (5): 953-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.5.953>.
- Schwarz, Nicole, et Rudolf E. Leube. 2016. « Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function ». *Cells* 5 (3): E30. <https://doi.org/10.3390/cells5030030>.
- Schwein, Paul A., et Christina M. Woo. 2020. « The O-GlcNAc Modification on Kinases ». *ACS Chemical Biology* 15 (3): 602-17. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b01015>.
- Scott, M. P., et W. T. Miller. 2000. « A Peptide Model System for Processive Phosphorylation by Src Family Kinases ». *Biochemistry* 39 (47): 14531-37. <https://doi.org/10.1021/bi001850u>.
- Segard, Bertrand-David, Florence Delort, Virginie Bailleux, Stéphanie Simon, Emilie Leccia, Blandine Gausseres, Fatma Briki, Patrick Vicart, et Sabrina Batonnet-Pichon. 2013. « N-Acetyl-L-Cysteine Prevents Stress-Induced Desmin Aggregation in Cellular Models of Desminopathy ». *PLoS One* 8 (10): e76361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076361>.
- Selcen, Duygu. 2011. « Myofibrillar Myopathies ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 21 (3): 161-71. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.12.007>.
- Selcen, Duygu, et Andrew G. Engel. 2003. « Myofibrillar Myopathy Caused by Novel Dominant Negative Alpha B-Crystallin Mutations ». *Annals of Neurology* 54 (6): 804-10. <https://doi.org/10.1002/ana.10767>.
- Sharma, Nikita S., Ashok K. Saluja, et Sulagna Banerjee. 2018. « "Nutrient-Sensing" and Self-Renewal: O-GlcNAc in a New Role ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 50 (3): 205-11. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9735-7>.
- Sharma, Sarika, Gloria M. Conover, Jayne L. Elliott, Ming Der Perng, Harald Herrmann, et Roy A. Quinlan. 2017. « AB-Crystallin Is a Sensor for Assembly Intermediates and for the Subunit Topology of Desmin Intermediate Filaments ». *Cell Stress & Chaperones* 22 (4): 613-26. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0788-7>.
- Shi, Hao, Alexander Munk, Thomas S. Nielsen, Morgan R. Daughtry, Louise Larsson, Shize Li, Kasper F. Høyer, et al. 2018. « Skeletal Muscle O-GlcNAc Transferase Is Important for Muscle Energy Homeostasis and Whole-Body Insulin Sensitivity ». *Molecular Metabolism* 11 (mai): 160-77. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.010>.
- Sihag, Ram K., Masaki Inagaki, Tomoya Yamaguchi, Thomas B. Shea, et Harish C. Pant. 2007. « Role of Phosphorylation on the Structural Dynamics and Function of Types III and IV Intermediate Filaments ». *Experimental Cell Research* 313 (10): 2098-2109. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.010>.
- Simon, Stéphanie, Valeriya Dimitrova, Benjamin Gibert, Sophie Viro, Nicole Mounier, Mathieu Nivon, Carole Kretz-Remy, Véronique Corset, Patrick Mehlen, et André-Patrick Arrigo. 2013. « Analysis of the Dominant Effects Mediated by Wild Type or R120G Mutant of AB-Crystallin (HspB5) towards Hsp27 (HspB1) ». *PLoS One* 8 (8): e70545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070545>.
- Simon, Stéphanie, Jean-Marc Fontaine, Jody L. Martin, Xiankui Sun, Adam D. Hoppe, Michael J. Welsh, Rainer Benndorf, et Patrick Vicart. 2007. « Myopathy-Associated AlphaB-Crystallin Mutants: Abnormal Phosphorylation, Intracellular Location, and Interactions with Other Small Heat Shock Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (47): 34276-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703267200>.
- Singh, Bhairab N., K. Sridhar Rao, Tangirala Ramakrishna, Nandini Rangaraj, et Ch Mohan Rao. 2007. « Association of AlphaB-Crystallin, a Small Heat Shock Protein, with Actin: Role in Modulating Actin Filament Dynamics in Vivo ». *Journal of Molecular Biology* 366 (3): 756-67. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.012>.

- Singh, Vishakha, Mahendra Ram, Rajesh Kumar, Raju Prasad, Birendra Kumar Roy, et Kaushal Kumar Singh. 2017. « Phosphorylation: Implications in Cancer ». *The Protein Journal* 36 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9696-z>.
- Slawson, Chad, T. Lakshmanan, Spencer Knapp, et Gerald W. Hart. 2008. « A Mitotic GlcNAcylation/Phosphorylation Signaling Complex Alters the Posttranslational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (10): 4130-40. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-11-1146>.
- Slawson, Chad, Natasha E. Zachara, Keith Vosseller, Win D. Cheung, M. Daniel Lane, et Gerald W. Hart. 2005. « Perturbations in O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (38): 32944-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503396200>.
- Smythe, G. M., M. J. Davies, D. Paulin, et M. D. Grounds. 2001. « Absence of Desmin Slightly Prolongs Myoblast Proliferation and Delays Fusion in Vivo in Regenerating Grafts of Skeletal Muscle ». *Cell and Tissue Research* 304 (2): 287-94. <https://doi.org/10.1007/s004410100366>.
- Snider, Natasha T., et M. Bishr Omary. 2014. « Post-Translational Modifications of Intermediate Filament Proteins: Mechanisms and Functions ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (3): 163-77. <https://doi.org/10.1038/nrm3753>.
- Snow, C. M., A. Senior, et L. Gerace. 1987. « Monoclonal Antibodies Identify a Group of Nuclear Pore Complex Glycoproteins ». *The Journal of Cell Biology* 104 (5): 1143-56. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.5.1143>.
- Sodek, J., R. S. Hodges, L. B. Smillie, et L. Jurasek. 1972. « Amino-Acid Sequence of Rabbit Skeletal Tropomyosin and Its Coiled-Coil Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (12): 3800-3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.12.3800>.
- Song J, Liu C, Wang X, Xu B, Liu X, Li Y, Xia J, Li Y, Zhang C, Li D, Sun H. O-GlcNAcylation Quantification of Certain Protein by the Proximity Ligation Assay and *Clostridium perfringens* OGA^{D298N}(CpOGA^{D298N}). *ACS Chem Biol*. 2021 Jun 18;16(6):1040-1049. doi: 10.1021/acscchembio.1c00185. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34105348.
- Spaendonck-Zwarts, K. Y. van, L. van Hessem, J. D. H. Jongbloed, H. E. K. de Walle, Y. Capetanaki, A. J. van der Kooi, I. M. van Langen, M. P. van den Berg, et J. P. van Tintelen. 2011. « Desmin-Related Myopathy ». *Clinical Genetics* 80 (4): 354-66. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01512.x>.
- Squire, John M., Hind A. Al-Khayat, Carlo Knupp, et Pradeep K. Luther. 2005. « Molecular Architecture in Muscle Contractile Assemblies ». *Advances in Protein Chemistry* 71: 17-87. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)71002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)71002-5).
- Srikanth, Budnar, Milind M. Vaidya, et Rajiv D. Kalraiya. 2010. « O-GlcNAcylation Determines the Solubility, Filament Organization, and Stability of Keratins 8 and 18 ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (44): 34062-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098996>.
- Steinert, P. M., Y. H. Chou, V. Prahlad, D. A. Parry, L. N. Marekov, K. C. Wu, S. I. Jang, et R. D. Goldman. 1999. « A High Molecular Weight Intermediate Filament-Associated Protein in BHK-21 Cells Is Nestin, a Type VI Intermediate Filament Protein. Limited Co-Assembly in Vitro to Form Heteropolymers with Type III Vimentin and Type IV Alpha-Internexin ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (14): 9881-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9881>.
- Stevens, Laurence, Bruno Bastide, Julie Hedou, Caroline Cieniewski-Bernard, Valérie Montel, Laetitia Cochon, Erwan Dupont, et Yvonne Mounier. 2013. « Potential Regulation of Human Muscle Plasticity by MLC2 Post-Translational Modifications during Bed Rest and Countermeasures ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 540 (1-2): 125-32. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.016>.
- Stone, Michele R., Andrea O'Neill, Dawn Catino, et Robert J. Bloch. 2005. « Specific Interaction of the Actin-Binding Domain of Dystrophin with Intermediate Filaments Containing Keratin 19 ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (9): 4280-93. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-02-0112>.
- Strelkov, Sergei V., Harald Herrmann, et Ueli Aebi. 2003. « Molecular Architecture of Intermediate Filaments ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 25 (3): 243-51. <https://doi.org/10.1002/bies.10246>.
- Stromer, M. H., et M. Bendayan. 1988. « Arrangement of Desmin Intermediate Filaments in Smooth Muscle Cells as Shown by High-Resolution Immunocytochemistry ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 11 (2): 117-25. <https://doi.org/10.1002/cm.970110205>.
- Su, Huabo, Jie Li, Hanming Zhang, Wenxia Ma, Ning Wei, Jinbao Liu, et Xuejun Wang. 2015. « COP9 Signalosome Controls the Degradation of Cytosolic Misfolded Proteins and Protects against Cardiac Proteotoxicity ». *Circulation Research* 117 (11): 956-66. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306783>.

- Sun, Yan V., et Yi-Juan Hu. 2016. « Integrative Analysis of Multi-Omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases ». *Advances in Genetics* 93: 147-90. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.004>.
- Szczesna, Danuta, Jiaju Zhao, Michelle Jones, Gang Zhi, James Stull, et James D. Potter. 2002. « Phosphorylation of the Regulatory Light Chains of Myosin Affects Ca²⁺ Sensitivity of Skeletal Muscle Contraction ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 92 (4): 1661-70. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00858.2001>.
- Szeverenyi, Ildiko, Andrew J. Cassidy, Cheuk Wang Chung, Bennett T. K. Lee, John E. A. Common, Stephen C. Ogg, Huijia Chen, et al. 2008. « The Human Intermediate Filament Database: Comprehensive Information on a Gene Family Involved in Many Human Diseases ». *Human Mutation* 29 (3): 351-60. <https://doi.org/10.1002/humu.20652>.
- Sziklai, Dominik, Judit Sallai, Zsombor Papp, Dalma Kellermayer, Zsolt Mártonfalvi, Ricardo H. Pires, et Miklós S. Z. Kellermayer. 2022. « Nanosurgical Manipulation of Titin and Its M-Complex ». *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 12 (2): 178. <https://doi.org/10.3390/nano12020178>.

T

- Tallent, Melanie K., Neal Varghis, Yuliya Skorobogatko, Lisa Hernandez-Cuebas, Kelly Whelan, David J. Vocadlo, et Keith Vosseller. 2009. « In Vivo Modulation of O-GlcNAc Levels Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity through Interplay with Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 174-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807431200>.
- Tao, J. X., et W. Ip. 1991. « Site-Specific Antibodies Block Kinase A Phosphorylation of Desmin in Vitro and Inhibit Incorporation of Myoblasts into Myotubes ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 19 (2): 109-20. <https://doi.org/10.1002/cm.970190206>.
- Tarbet, Heather J., Lee Dolat, Timothy J. Smith, Brett M. Condon, E. Timothy O'Brien, Raphael H. Valdivia, et Michael Boyce. 2018. « Site-Specific Glycosylation Regulates the Form and Function of the Intermediate Filament Cytoskeleton ». *ELife* 7 (mars): e31807. <https://doi.org/10.7554/eLife.31807>.
- Tarbet, Heather J., Clifford A. Toleman, et Michael Boyce. 2018. « A Sweet Embrace: Control of Protein-Protein Interactions by O-Linked β -N-Acetylglucosamine ». *Biochemistry* 57 (1): 13-21. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00871>.
- Tashima, Yuko, et Pamela Stanley. 2014. « Antibodies That Detect O-Linked β -D-N-Acetylglucosamine on the Extracellular Domain of Cell Surface Glycoproteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (16): 11132-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.492512>.
- Taylor, Erik N., Matthew P. Hoffman, David Y. Barefield, George E. Aninwene, Aurash D. Abrishamchi, Thomas L. Lynch, Suresh Govindan, et al. 2016. « Alterations in Multi-Scale Cardiac Architecture in Association With Phosphorylation of Myosin Binding Protein-C ». *Journal of the American Heart Association* 5 (3): e002836. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002836>.
- Tedesco, B., R. Cristofani, V. Ferrari, M. Cozzi, P. Rusmini, E. Casarotto, M. Chierichetti, et al. 2022. « Insights on Human Small Heat Shock Proteins and Their Alterations in Diseases ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 9: 842149. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.842149>.
- Thompson, Andrew, Jürgen Schäfer, Karsten Kuhn, Stefan Kienle, Josef Schwarz, Günter Schmidt, Thomas Neumann, R. Johnstone, A. Karim A. Mohammed, et Christian Hamon. 2003. « Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS ». *Analytical Chemistry* 75 (8): 1895-1904. <https://doi.org/10.1021/ac0262560>.
- Thornell, L., L. Carlsson, Z. Li, M. Mericskay, et D. Paulin. 1997. « Null Mutation in the Desmin Gene Gives Rise to a Cardiomyopathy ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (8): 2107-24. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0446>.
- Tidball, J. G. 1992. « Desmin at Myotendinous Junctions ». *Experimental Cell Research* 199 (2): 206-12. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90425-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90425-8).
- Toivola, D. M., R. D. Goldman, D. R. Garrod, et J. E. Eriksson. 1997. « Protein Phosphatases Maintain the Organization and Structural Interactions of Hepatic Keratin Intermediate Filaments ». *Journal of Cell Science* 110 (Pt 1) (janvier): 23-33. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.1.23>.
- Tokuyasu, K. T., A. H. Dutton, et S. J. Singer. 1983. « Immunoelectron Microscopic Studies of Desmin (Skeletin) Localization and Intermediate Filament Organization in Chicken Cardiac Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 96 (6): 1736-42. <https://doi.org/10.1083/jcb.96.6.1736>.

- Torres, C. R., et G. W. Hart. 1984. « Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. Evidence for O-Linked GlcNAc ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (5): 3308-17.
- Tsikitis, Mary, Zoi Galata, Manolis Mavroidis, Stelios Psarras, et Yassemi Capetanaki. 2018. « Intermediate Filaments in Cardiomyopathy ». *Biophysical Reviews* 10 (4): 1007-31. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0443-2>.
- Tylková, Lucia. 2009. « Architectural and Functional Remodeling of Cardiac and Skeletal Muscle Cells in Mice Lacking Specific Isoenzymes of Creatine Kinase ». *General Physiology and Biophysics* 28 (3): 219-24. https://doi.org/10.4149/gpb_2009_03_219.

U

- Ubersax, Jeffrey A., et James E. Ferrell. 2007. « Mechanisms of Specificity in Protein Phosphorylation ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7): 530-41. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>.
- Umapathi, Priya, Olurotimi O. Mesubi, Partha S. Banerjee, Neha Abrol, Qinchuan Wang, Elizabeth D. Luczak, Yuejin Wu, et al. 2021. « Excessive O-GlcNAcylation Causes Heart Failure and Sudden Death ». *Circulation* 143 (17): 1687-1703. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051911>.
- Unger, Andreas, Lisa Beckendorf, Pierre Böhme, Rudolf Kley, Marion von Frieling-Salewsky, Hanns Lochmüller, Rolf Schröder, Dieter O. Fürst, Matthias Vorgerd, et Wolfgang A. Linke. 2017. « Translocation of Molecular Chaperones to the Titin Springs Is Common in Skeletal Myopathy Patients and Affects Sarcomere Function ». *Acta Neuropathologica Communications* 5 (1): 72. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0474-0>.

V

- Vattemi, G., P. Tonin, M. Mora, M. Filosto, L. Morandi, C. Savio, I. Dal Pra, N. Rizzuto, et G. Tomelleri. 2004. « Expression of Protein Kinase C Isoforms and Interleukin-1beta in Myofibrillar Myopathy ». *Neurology* 62 (10): 1778-82. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000125197.70310.8e>.
- Vercoutter-Edouart, Anne-Sophie, Ikram El Yazidi-Belkoura, Céline Guinez, Steffi Baldini, Maité Leturcq, Marlène Mortuaire, Anne-Marie Mir, et al. 2015. « Detection and Identification of O-GlcNAcylated Proteins by Proteomic Approaches ». *Proteomics* 15 (5-6): 1039-50. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400326>.
- Very, Ninon, Agata Steenackers, Caroline Dubuquoy, Jeanne Vermuse, Laurent Dubuquoy, Tony Lefebvre, et Ikram El Yazidi-Belkoura. 2018. « Cross Regulation between MTOR Signaling and O-GlcNAcylation ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 50 (3): 213-22. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9747-y>.
- Vicart, P., A. Caron, P. Guicheney, Z. Li, M. C. Prévost, A. Faure, D. Chateau, et al. 1998. « A Missense Mutation in the AlphaB-Crystallin Chaperone Gene Causes a Desmin-Related Myopathy ». *Nature Genetics* 20 (1): 92-95. <https://doi.org/10.1038/1765>.
- Vocadlo, David J. 2012. « O-GlcNAc Processing Enzymes: Catalytic Mechanisms, Substrate Specificity, and Enzyme Regulation ». *Current Opinion in Chemical Biology* 16 (5-6): 488-97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.021>.
- Vogel, Britta, Benjamin Meder, Steffen Just, Christina Laufer, Ina Berger, Sabrina Weber, Hugo A. Katus, et Wolfgang Rottbauer. 2009. « In-Vivo Characterization of Human Dilated Cardiomyopathy Genes in Zebrafish ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (3): 516-22. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.129>.
- Volodin, Alexandra, Idit Kosti, Alfred Lewis Goldberg, et Shenhav Cohen. 2017. « Myofibril Breakdown during Atrophy Is a Delayed Response Requiring the Transcription Factor PAX4 and Desmin Depolymerization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (8): E1375-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612988114>.
- Vosseller, Keith, Kirk C. Hansen, Robert J. Chalkley, Jonathan C. Trinidad, Lance Wells, Gerald W. Hart, et Alma L. Burlingame. 2005. « Quantitative Analysis of Both Protein Expression and Serine / Threonine Post-Translational Modifications through Stable Isotope Labeling with Dithiothreitol ». *Proteomics* 5 (2): 388-98. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401066>.

Vosseller, Keith, Jonathan C. Trinidad, Robert J. Chalkley, Christian G. Specht, Agnes Thalhammer, Aenoch J. Lynn, June O. Snedecor, et al. 2006. « O-Linked N-Acetylglucosamine Proteomics of Postsynaptic Density Preparations Using Lectin Weak Affinity Chromatography and Mass Spectrometry ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 5 (5): 923-34. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500040-MCP200>.

W

- Walsh, Christopher T., Sylvie Garneau-Tsodikova, et Gregory J. Gatto. 2005. « Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 44 (45): 7342-72. <https://doi.org/10.1002/anie.200501023>.
- Walter, Lisa A., Yu Hsuan Lin, Christopher J. Halbrook, Kelly N. Chuh, Lina He, Nichole J. Pedowitz, Anna R. Batt, et al. 2020. « Inhibiting the Hexosamine Biosynthetic Pathway Lowers O-GlcNAcylation Levels and Sensitizes Cancer to Environmental Stress ». *Biochemistry* 59 (34): 3169-79. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00560>.
- Wang, Xun, Zhihui Feng, Xueqiang Wang, Liang Yang, Shujun Han, Ke Cao, Jie Xu, Lin Zhao, Yong Zhang, et Jiankang Liu. 2016. « O-GlcNAcase Deficiency Suppresses Skeletal Myogenesis and Insulin Sensitivity in Mice through the Modulation of Mitochondrial Homeostasis ». *Diabetologia* 59 (6): 1287-96. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3919-2>.
- Wang, Yan, et Wei-Dong Le. 2019. « Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1206: 527-50. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_25.
- Wang, Zhexin, Michael Grange, Thorsten Wagner, Ay Lin Kho, Mathias Gautel, et Stefan Raunser. 2021. « The Molecular Basis for Sarcomere Organization in Vertebrate Skeletal Muscle ». *Cell* 184 (8): 2135-2150.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.047>.
- Wang, Zihao, Marjan Gucek, et Gerald W. Hart. 2008. « Cross-Talk between GlcNAcylation and Phosphorylation: Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Response to Globally Elevated O-GlcNAc ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (37): 13793-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806216105>.
- Wang, Zihao, Akhilesh Pandey, et Gerald W. Hart. 2007. « Dynamic Interplay between O-Linked N-Acetylglucosaminylation and Glycogen Synthase Kinase-3-Dependent Phosphorylation ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6 (8): 1365-79. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600453-MCP200>.
- Wang, Zihao, Namrata D. Udeshi, Meaghan O'Malley, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, et Gerald W. Hart. 2010. « Enrichment and Site Mapping of O-Linked N-Acetylglucosamine by a Combination of Chemical/Enzymatic Tagging, Photochemical Cleavage, and Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (1): 153-60. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900268-MCP200>.
- Wanschit, J., S. Nakano, B. Goudeau, T. Ströbel, W. Rinner, G. Wimmer, H. Resch, et al. 2002. « Myofibrillar (Desmin-Related) Myopathy: Clinico-Pathological Spectrum in 3 Cases and Review of the Literature ». *Clinical Neuropathology* 21 (5): 220-31.
- Warrick, H. M., et J. A. Spudich. 1987. « Myosin Structure and Function in Cell Motility ». *Annual Review of Cell Biology* 3: 379-421. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.03.110187.002115>.
- Watson, Lewis J., Bethany W. Long, Angelica M. DeMartino, Kenneth R. Brittian, Ryan D. Readnower, Robert E. Brainard, Timothy D. Cummins, Lakshmanan Annamalai, Bradford G. Hill, et Steven P. Jones. 2014. « Cardiomyocyte Ogt Is Essential for Postnatal Viability ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 306 (1): H142-153. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00438.2013>.
- Wells, Lance, Yuan Gao, James A. Mahoney, Keith Vosseller, Chen Chen, Antony Rosen, et Gerald W. Hart. 2002. « Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Further Characterization of the Nucleocytoplasmic Beta-N-Acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1755-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109656200>.
- Wells, Lance, Lisa K. Kreppel, Frank I. Comer, Brian E. Wadzinski, et Gerald W. Hart. 2004. « O-GlcNAc Transferase Is in a Functional Complex with Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (37): 38466-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406481200>.
- Whisenhunt, Thomas R., Xiaoyong Yang, Damon B. Bowie, Andrew J. Paterson, Brian A. Van Tine, et Jeffrey E. Kudlow. 2006. « Disrupting the Enzyme Complex Regulating O-GlcNAcylation Blocks Signaling and Development ». *Glycobiology* 16 (6): 551-63. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj096>.
- Whittaker, R., M. S. Glassy, N. Gude, M. A. Sussman, R. A. Gottlieb, et C. C. Glembotski. 2009. « Kinetics of the Translocation and Phosphorylation of AlphaB-Crystallin in Mouse Heart Mitochondria during Ex Vivo

- Ischemia ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 296 (5): H1633-1642. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01227.2008>.
- Willis, Monte S., Jonathan C. Schisler, Andrea L. Portbury, et Cam Patterson. 2009. « Build It Up-Tear It down: Protein Quality Control in the Cardiac Sarcomere ». *Cardiovascular Research* 81 (3): 439-48. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn289>.
- Winter, Daniel L., Denise Paulin, Mathias Mericskay, et Zhenlin Li. 2014. « Posttranslational Modifications of Desmin and Their Implication in Biological Processes and Pathologies ». *Histochemistry and Cell Biology* 141 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1148-z>.
- Winter, L., A. Unger, C. Berwanger, M. Spörrer, M. Türk, F. Chevessier, K.-H. Strucksberg, et al. 2019. « Imbalances in Protein Homeostasis Caused by Mutant Desmin ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 45 (5): 476-94. <https://doi.org/10.1111/nan.12516>.
- Wu, Donglu, Yong Cai, et Jingji Jin. 2017. « Potential Coordination Role between O-GlcNAcylation and Epigenetics ». *Protein & Cell* 8 (10): 713-23. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0416-4>.
- Wulff-Fuentes, Eugenia, Rex R. Berendt, Logan Massman, Laura Danner, Florian Malard, Jeet Vora, Robel Kahsay, et Stephanie Olivier-Van Stichelen. 2021. « The Human O-GlcNAc Database and Meta-Analysis ». *Scientific Data* 8 (1): 25. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00810-4>.

X

- Xie, Shutao, Nana Jin, Jianlan Gu, Jianhua Shi, Jianming Sun, Dandan Chu, Liang Zhang, et al. 2016. « O-GlcNAcylation of Protein Kinase A Catalytic Subunits Enhances Its Activity: A Mechanism Linked to Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease ». *Aging Cell* 15 (3): 455-64. <https://doi.org/10.1111/accel.12449>.

Y

- Yan, Wei, Minghui Cao, Xianhui Ruan, Li Jiang, Sylvia Lee, Adriana Lemaneck, Majid Ghassemian, et al. 2022. « Cancer-Cell-Secreted MiR-122 Suppresses O-GlcNAcylation to Promote Skeletal Muscle Proteolysis ». *Nature Cell Biology* 24 (5): 793-804. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00893-0>.
- Yang, Xiaoyong, Pat P. Ongusaha, Philip D. Miles, Joyce C. Havstad, Fengxue Zhang, W. Venus So, Jeffrey E. Kudlow, et al. 2008. « Phosphoinositide Signalling Links O-GlcNAc Transferase to Insulin Resistance ». *Nature* 451 (7181): 964-69. <https://doi.org/10.1038/nature06668>.
- Yang, Xiaoyong, et Kevin Qian. 2017. « Protein O-GlcNAcylation: Emerging Mechanisms and Functions ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (7): 452-65. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.22>.
- Yang, Y., et T. Makita. 1996. « Immunocytochemical Colocalization of Desmin and Vimentin in Human Fetal Skeletal Muscle Cells ». *The Anatomical Record* 246 (1): 64-70. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199609\)246:1<64::AID-AR7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199609)246:1<64::AID-AR7>3.0.CO;2-F).
- Yang, Yunfan, Minnie Fu, Min-Dian Li, Kaisi Zhang, Bichen Zhang, Simeng Wang, Yuyang Liu, et al. 2020. « O-GlcNAc Transferase Inhibits Visceral Fat Lipolysis and Promotes Diet-Induced Obesity ». *Nature Communications* 11 (1): 181. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13914-8>.
- Yu, Seok-Ho, Michael Boyce, Amberlyn M. Wands, Michelle R. Bond, Carolyn R. Bertozzi, et Jennifer J. Kohler. 2012. « Metabolic Labeling Enables Selective Photocrosslinking of O-GlcNAc-Modified Proteins to Their Binding Partners ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (13): 4834-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114356109>.
- Yuzwa, Scott A., Matthew S. Macauley, Julia E. Heinonen, Xiaoyang Shan, Rebecca J. Dennis, Yuan He, Garrett E. Whitworth, et al. 2008. « A Potent Mechanism-Inspired O-GlcNAcase Inhibitor That Blocks Phosphorylation of Tau in Vivo ». *Nature Chemical Biology* 4 (8): 483-90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.96>.
- Yuzwa, Scott A., et David J. Vocadlo. 2009. « O-GlcNAc Modification and the Tauopathies: Insights from Chemical Biology ». *Current Alzheimer Research* 6 (5): 451-54. <https://doi.org/10.2174/156720509789207967>.

Z

- Zachara, Natasha E. 2009. « Detecting the “O-GlcNAc-Ome”; Detection, Purification, and Analysis of O-GlcNAc Modified Proteins ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 534: 251-79. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-022-5_19.
- Zeidan, Quira, et Gerald W. Hart. 2010. « The Intersections between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Implications for Multiple Signaling Pathways ». *Journal of Cell Science* 123 (Pt 1): 13-22. <https://doi.org/10.1242/jcs.053678>.
- Zhang, Fengxue, Kaihong Su, Xiaoyong Yang, Damon B. Bowe, Andrew J. Paterson, et Jeffrey E. Kudlow. 2003. « O-GlcNAc Modification Is an Endogenous Inhibitor of the Proteasome ». *Cell* 115 (6): 715-25. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00974-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00974-7).
- Zhang, Wei, Jiarong Liu, Ling Tian, Qinglan Liu, Yuchang Fu, et W. Timothy Garvey. 2013. « TRIB3 Mediates Glucose-Induced Insulin Resistance via a Mechanism That Requires the Hexosamine Biosynthetic Pathway ». *Diabetes* 62 (12): 4192-4200. <https://doi.org/10.2337/db13-0312>.
- Zhang, Yaoyang, Bryan R. Fonslow, Bing Shan, Moon-Chang Baek, et John R. Yates. 2013. « Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics ». *Chemical Reviews* 113 (4): 2343-94. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>.
- Zhou, Wenyuan, et Alexander Deiters. 2021. « Chemogenetic and Optogenetic Control of Post-Translational Modifications through Genetic Code Expansion ». *Current Opinion in Chemical Biology* 63 (août): 123-31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.02.016>.
- Zhu, Yi, et Gerald W. Hart. 2021. « Targeting O-GlcNAcylation to Develop Novel Therapeutics ». *Molecular Aspects of Medicine* 79 (juin): 100885. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100885>.

ANNEXES

G_DSB RipA						H_CLB RipA						I_CLB SDS					
Protein Group	Accession	Other accession number	Coverage (%)	#Peptides	Description	Protein Group	Accession	Other accession number	Coverage (%)	#Peptides	Description	Protein Group	Accession	Other accession number	Coverage (%)	#Peptides	Description
CYTOSKELETON AND MYOFIBRILLAR PROTEINS																	
	5 P68134		89	48	Actin alpha skeletal muscle		6 P68134		84	51	Actin alpha skeletal muscle		5 P68134		68	48	Actin alpha skeletal muscle
	61 Q77PR4		10	8	Alpha-actinin-1		120 Q77PR4		8	6	Alpha-actinin-1		82 Q77PR4		8	8	Alpha-actinin-1
	85 Q9J191		4	4	Alpha-actinin-2								181 Q9J191		3	3	Alpha-actinin-2
	44 O88990		24	18	Alpha-actinin-3		133 O88990		6	5	Alpha-actinin-3		125 O88990		5	5	Alpha-actinin-3
	60 P57780		13	10	Alpha-actinin-4		122 P57780		7	6	Alpha-actinin-4		81 P57780		8	7	Alpha-actinin-4
							31 P07356		74	23	Annexin A2		30 P07356		69	22	Annexin A2
							57 P14824		27	16	Annexin A6						
	26 Q8BFZ3		52	25	Beta-actin-like protein 2		30 Q8BFZ3		35	23	Beta-actin-like protein 2		24 Q8BFZ3		33	22	Beta-actin-like protein 2
							151 Q8BMK4		7	3	Cytoskeleton-associated protein 4						
	2 P31001		85	55	Desmin		3 P31001		88	64	Desmin		2 P31001		83	53	Desmin
							322 Q8BW94		0	4	Dynein heavy chain 3 axonemal		238 Q8BW94		0	3	Dynein heavy chain 3 axonemal
	114 Q8VHE6	0	2	2	Dynein heavy chain 5 axonemal		190 Q8VHE6	0	4	4	Dynein heavy chain 5 axonemal						
	28 P11276		21	34	Fibronectin		66 P11276		8	12	Fibronectin		72 P11276		8	11	Fibronectin
	71 Q8BTM8		2	6	Filamin-A		146 Q8BTM8		2	4	Filamin-A		105 Q8BTM8		2	5	Filamin-A
	48 Q8VHX6		8	16	Filamin-C		34 Q8VHX6		18	32	Filamin-C		36 Q8VHX6		13	23	Filamin-C
							320 A2AUC9		3	3	Kelch-like protein 41		329 A2AUC9		3	2	Kelch-like protein 41
	84 P07744		5	3	Keratin type II cytoskeletal 4		119 P07744		2	2	Keratin type II cytoskeletal 4		202 P07744		2	2	Keratin type II cytoskeletal 4
							76 Q9DCV7		5	4	Keratin type II cytoskeletal 7						
	63 P11679		4	4	Keratin type II cytoskeletal 8		75 P11679		4	4	Keratin type II cytoskeletal 8		80 P11679		4	4	Keratin type II cytoskeletal 8
	111 Q9QXZ0		0	4	Microtubule-actin cross-linking factor 1		212 Q9QXZ0		1	5	Microtubule-actin cross-linking factor 1		194 Q9QXZ0		1	4	Microtubule-actin cross-linking factor 1
	23 Q5SX40		22	38	Myosin-1		4 Q5SX40		41	78	Myosin-1		13 Q5SX40		38	70	Myosin-1
	4 P13541		51	89	Myosin-3		1 P13541		67	162	Myosin-3		1 P13541		61	131	Myosin-3
							16 Q5SX39		31	61	Myosin-4		18 Q5SX39		27	54	Myosin-4
	41 Q02566		11	22	Myosin-6		23 Q02566		19	44	Myosin-6		26 Q02566		14	34	Myosin-6
							25 Q91283		19	43	Myosin-7						
	25 P13542		20	36	Myosin-8												
	122 Q8VDD5		2	3	Myosin-9		28 Q8VDD5		24	37	Myosin-9		31 Q8VDD5		20	28	Myosin-9
	151 Q61879		1	2	Myosin-10		96 Q61879		2	6	Myosin-10		123 Q61879		2	5	Myosin-10
													135 O08638		2	3	Myosin-11
													134 Q6URW6		2	3	Myosin-14
							82 Q6URW6		3	7	Myosin-14						
							113 P70402		11	4	Myosin-binding protein H		169 P70402		4	2	Myosin-binding protein H
	57 P05977		50	9	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform		46 P05977		66	14	Myosin light chain 1/3 skeletal muscle isoform		48 P05977		63	11	Myosin light chain 1/3 skeletal muscle isoform
					Myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform						Myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform						Myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle isoform
	52 P97457		66	35	P97457		35 P97457		83	18	isoform		39 P97457		73	11	isoform
							100 P09542		17	3	Myosin light chain 3						
	74 P09541		23	3	Myosin light chain 4		51 P09541		67	8	Myosin light chain 4		60 P09541		59	7	Myosin light chain 4
	148 Q60605		19	2	Myosin light polypeptide 6		78 Q60605		51	6	Myosin light polypeptide 6		88 Q60605		30	4	Myosin light polypeptide 6
	77 Q8C143		27	4	Myosin light chain 6B		53 Q8C143		59	11	Myosin light chain 6B		58 Q8C143		46	10	Myosin light chain 6B
							92 Q3THE2		34	6	Myosin regulatory light chain 12B						
	17 Q6PSH2		39	55	Nestin		18 Q6PSH2		30	44	Nestin		21 Q6PSH2		30	40	Nestin
							313 Q6ZWR6		0	6	Nesprin-1		259 Q6ZWR6		0	6	Nesprin-1
	36 Q9QXS1		9	33	Plectin		15 Q9QXS1		22	91	Plectin		20 Q9QXS1		16	70	Plectin
	50 P15331		10	9	Peripherin		50 P15331		10	8	Peripherin		56 P15331		11	8	Peripherin
	15 P48678		71	49	Prelamin-A/C		17 P48678		65	45	Prelamin-A/C		19 P48678		55	35	Prelamin-A/C
	39 P58771		63	23	Tropomyosin alpha-1 chain		29 P58771		74	32	Tropomyosin alpha-1 chain		38 P58771		56	20	Tropomyosin alpha-1 chain
							43 P21107		36	15	Tropomyosin alpha-3 chain						
							70 Q6IRU2		23	7	Tropomyosin alpha-4 chain		106 Q6IRU2		23	5	Tropomyosin alpha-4 chain
	30 P58774		61	24	Tropomyosin beta chain		21 P58774		83	39	Tropomyosin beta chain		29 P58774		65	26	Tropomyosin beta chain
							325 Q3TVV5		4	4	Trichoplein keratin filament-binding protein						
	102 P20801		22	3	Troponin C skeletal muscle												
	64 Q9WUZ5		25	6	Troponin I, slow skeletal muscle		240 Q9WUZ5		10	2	Troponin I slow skeletal muscle						
	144 P13412		17	2	Troponin I fast skeletal muscle		210 P13412		26	4	Troponin I fast skeletal muscle						
	79 P50752		17	5	Troponin T cardiac muscle		114 P50752		21	6	Troponin T, cardiac muscle		175 P50752		11	3	Troponin T cardiac muscle
	127 O88346		13	3	Troponin T slow skeletal muscle												
							61 Q9QZ47		35	11	Troponin T fast skeletal muscle		76 Q9QZ47		31	7	Troponin T fast skeletal muscle
	P68369				Tubulin alpha		P68369				Tubulin alpha		P68369				Tubulin alpha
	Q7TMM9		20	7	Tubulin beta		Q7TMM9		26	8	Tubulin beta		Q7TMM9		36	11	Tubulin beta
	1 P20152		91	60	Vimentin		2 P20152		94	73	Vimentin		3 P20152		89	54	Vimentin
	91 Q64727		7	3	Vinculin		162 Q64727		6	3	Vinculin		206 Q64727		4	2	Vinculin

Article 1



OPEN

Global O-GlcNAcylation changes impact desmin phosphorylation and its partition toward cytoskeleton in C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes

Charlotte Claeysen, Bruno Bastide & Caroline Cieniewski-Bernard

Desmin is the guardian of striated muscle integrity, permitting the maintenance of muscle shape and the efficiency of contractile activity. It is also a key mediator of cell homeostasis and survival. To ensure the fine regulation of skeletal muscle processes, desmin is regulated by post-translational modifications (PTMs). It is more precisely phosphorylated by several kinases connecting desmin to intracellular processes. Desmin is also modified by O-GlcNAcylation, an atypical glycosylation. However, the functional consequence of O-GlcNAcylation on desmin is still unknown, nor its impact on desmin phosphorylation. In a model of C2C12 myotubes, we modulated the global O-GlcNAcylation level, and we determined whether the expression, the PTMs and the partition of desmin toward insoluble material or cytoskeleton were impacted or not. We have demonstrated in the herein paper that O-GlcNAcylation variations led to changes in desmin behaviour. In particular, our data clearly showed that O-GlcNAcylation increase led to a decrease of phosphorylation level on desmin that seems to involve CamKII correlated to a decrease of its partition toward cytoskeleton. Our data showed that phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay is highly complex on desmin, supporting that a PTMs signature could occur on desmin to finely regulate its partition (i.e. distribution) with a spatio-temporal regulation.

Intermediate filaments (IFs) are a major and elaborated cytoskeletal network that is at least ten-fold more abundant than microfilaments or microtubules¹. The major function of IFs is the maintenance of cell shape and architecture, conferring resistance of cells towards mechanical stresses. They also contribute to the organization of cells because of their interaction with organelles. Indeed, IFs interact with mitochondria and modulate energy fluxes^{2,3}. Moreover, they contribute to the organization of cells into tissues as IFs interact with adhesive structures such as focal adhesions or desmosomes¹. Initially considered as static structures, it is nowadays well admitted that IFs are on the contrary highly dynamic and able to respond rapidly to cellular demands. Strong regulators of IFs dynamics are post-translational modifications (PTMs), in particular phosphorylation and O-N-acetyl- β -D-glucosaminylation (O-GlcNAcylation) that modulate the IFs dynamics and interactions in response to signalling pathways⁴⁻⁷. Beyond their mechanical role, IFs are a nodal point within cells because of their interaction with a growing number of proteins, in particular proteins of signalling pathways. As a consequence, IFs are both targets and active contributors of intracellular signalling. As modifiers and organizers of signalling, IFs contribute to a dynamic cell behaviour (development, proliferation, migration, apoptosis...) and in larger extent to tissue homeostasis (regeneration, wound healing...) ^{4,8-11}.

Among the constitutive proteins of IFs, desmin is the major protein of type III IFs in striated muscles as it represents 2% and 0.35% of total proteins in heart and skeletal muscles, respectively¹². Desmin interactome is vast^{13,14}. This protein forms a continuous transcytoplasmic network around Z-discs through specific interactions with a plethora of structural proteins, permitting the maintenance of lateral alignment of myofibrils, the

Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ULR 7369 - URéPSSS - Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société, F-59000 Lille, France. email: caroline.cieniewski-bernard@univ-lille.fr

cytoskeletal lattice of muscle and the anchoring of mitochondria and nuclei^{13,15,16}. Over the preservation of muscle integrity and the involvement in contractile activity, desmin is also a key mediator of cellular homeostasis and survival because of its implication in several cellular processes such as differentiation, apoptosis, intracellular signalling, mechanotransduction, vesicle trafficking, organelle biogenesis and/or positioning, calcium homeostasis, protein homeostasis and the regulation of metabolism and gene expression^{12–14,17}. Desmin bears several PTMs, in particular phosphorylation by several kinases that connect desmin to different cellular processes such as cell division, myoblast differentiation or muscle contraction¹⁸. Hence, desmin is strongly associated to the aetiology of several muscle pathologies such as dilated cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy, atypical cardiomyopathy, heart failure, sleep apnea, asthma, respiratory insufficiency, dysphagia, myofibrillar myopathies or muscle wasting^{18–21}. Desmin-related myopathy and cardiomyopathy (i.e. desminopathies) could result from mutation in the desmin gene, cleavage of desmin, and/or changes on post-translational modifications, leading to an altered desmin network and the formation of toxic desmin aggregates^{14,22–25}. As a consequence, desmin function is lost, leading to improper mitochondrial function, loss of cell adhesion and cell–cell communication, fibrosis and inflammation¹⁴. Importantly, these toxic aggregates are seeding-competent amyloid aggregates that persist in muscle fibers^{26,27}, and these preamyloid and amyloid oligomers formation and deposition result from detrimental phosphorylation in heart failure^{28,29}.

As mentioned previously, desmin is highly post-translationally modified, especially through phosphorylation¹⁸. However, desmin is not only phosphorylated but also modified by an atypical glycosylation: the O-N-acetyl-β-D-glucosaminyl (O-GlcNAcylation)³⁰. The O-GlcNAcylation is an atypical glycosylation corresponding to the transfer of a unique monosaccharide, the N-acetyl-D-glucosamine, on serine or threonine hydroxyl group of a protein; O-GlcNAcylation is highly dynamic and reversible, presenting a dynamic interplay with phosphorylation³¹. The O-GlcNAcylation is highly abundant on cytoskeletal proteins; in particular, keratin 8 and 18 which are involved in the development and differentiation of various tissues are O-GlcNAcylated. Interestingly, while phosphorylation regulated protein interaction, ubiquitination and filament organization of keratins, O-GlcNAcylation was demonstrated to modulate the phosphorylation level of IFs^{32,33} and increase keratins solubility^{5,34}, ubiquitination and proteasomal degradation of IFs proteins³⁵. Moreover, O-GlcNAcylation was linked to the modulation of IFs, in particular vimentin⁶ and keratin 8/18 filaments^{5,36}, with a link between O-GlcNAcylation and cell survival in stress condition³⁴. In skeletal muscle, O-GlcNAcylation extensively modifies other nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins and also myofibrillar proteins³⁷. We have previously demonstrated that motor and regulatory proteins are O-GlcNAcylated modulating so the contractile properties of skeletal muscle such as calcium activation parameters^{30,38–41}. Supporting a key role of this atypical glycosylation, the alteration in the number or the linkage of O-GlcNAc moieties is closely associated to the physiopathology of several diseases and in particular neuromuscular pathologies (polymyositis, dermatomyositis, sporadic inclusion body myositis, muscular dystrophies, neurogenic muscular atrophy, rhabdomyolysis, and distal myopathy with rimmed vacuoles)⁴². Interestingly, some of the O-GlcNAc sites correspond to mutated sites closely associated to the development of muscle pathologies such as Laing myopathy⁴³ or desminopathies⁴⁴. The O-GlcNAc modification was also demonstrated to be involved in skeletal muscle atrophy^{39,45,46}. Moreover, recent data from our lab underlined the crucial role of O-GlcNAcylation in the modulation of contractile activity, in the structuration of sarcomeric cytoskeleton and in the modulation of protein–protein interactions (for review, see³⁷). Indeed, we have recently demonstrated that the two enzymes responsible of the O-GlcNAcylation process are located in the nodal Z-line³⁹, and that several myofibrillar proteins are O-GlcNAc-modified, such as αB-crystallin, α-actinin or desmin among others^{30,38}. We have also demonstrated in a cellular model of C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes that O-GlcNAcylation could be involved in the organization and reorganization of sarcomere. Importantly, we showed that sarcomere reorganization was linked to a modulation of several multiprotein complexes and some of them include key structural proteins, in particular desmin and its molecular chaperone, the αB-crystallin⁴⁷. To support this role of O-GlcNAcylation in the modulation of desmin interactome (in particular the interaction with αB-crystallin), O-GlcNAc sites modifying both proteins are located into interaction domains⁴⁴, and our data also suggest that their interaction could be impacted by O-GlcNAcylation changes⁴⁷.

However, the precise impact of O-GlcNAcylation on desmin, the guardian of striated muscle integrity, remains poorly understood. The major objective of our study was to reveal the role of O-GlcNAcylation on desmin features. For this purpose, we increased or decreased the global O-GlcNAcylation level on C2C12 myotubes using pharmacological molecules inhibiting OGA or OGT (the two enzymes involved in O-GlcNAcylation and de-O-GlcNAcylation process) respectively, and investigated whether the global O-GlcNAcylation level should impact the desmin behaviour or not. We focused particularly on its expression, its partition toward cytoskeleton or insoluble fraction, and the variations of phosphorylation and O-GlcNAcylation on desmin.

Materials and methods

C2C12 cells culture. *Myoblasts proliferation and differentiation.* The C2C12 mouse myoblasts (ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA) were cultured in proliferation medium [PM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco); 10% foetal calf serum (Gibco); 1% antibiotics/antimycotics (Sigma)]. Cells were put in plate of 8.8 cm² at a density of 2×10^5 cells/ml in PM. When reaching 80–90% confluence, PM was changed toward differentiation medium [DM: DMEM (Gibco); 2% heat inactivated horse serum (Gibco); 1% antibiotics/antimycotics (Sigma)]. This medium change corresponds to day 0 of differentiation. Cells were cultured into an incubator at 37 °C, 5% CO₂ and saturated humidity, and culture media were changed every 2 days.

Pharmacological treatments. After 5 days of differentiation, C2C12 myotubes were treated by pharmacological molecules applied overnight. We used 5 μM of Ac₄-5S-GlcNAc (peracetyl-5-thio-GlcNAc; generous gift from Pr

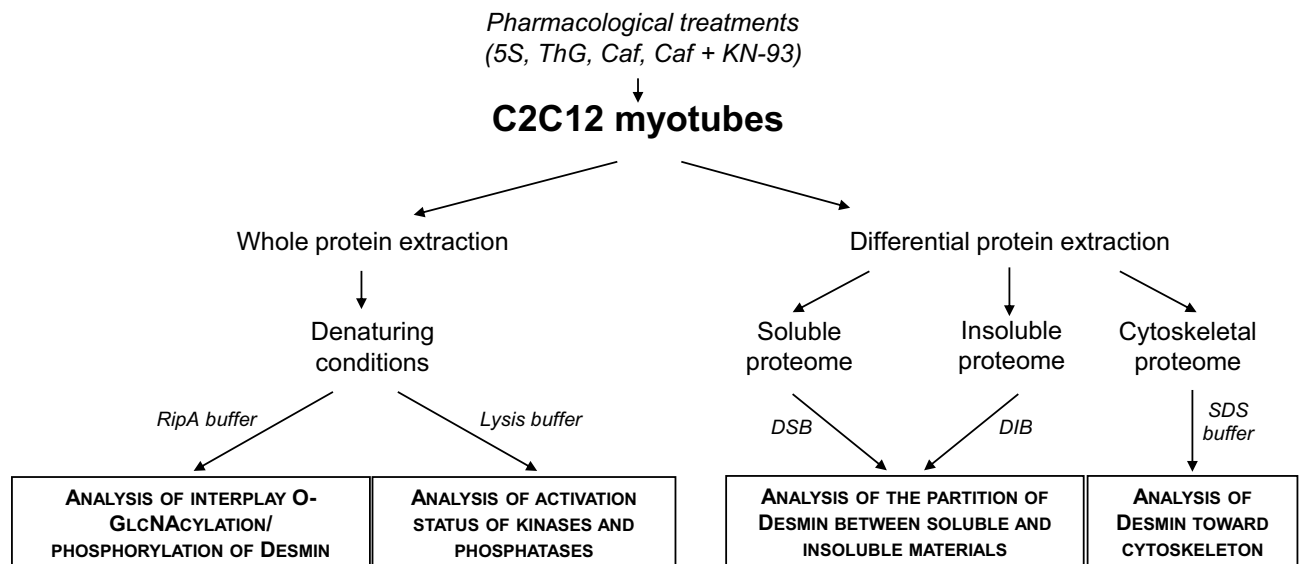


Figure 1. Recapitulative scheme of the different protein extraction protocols. This scheme indicated the protein subcellular fractions obtained, the corresponding buffers used and the downstream analyses for each fraction.

D.Vocadlo, Simon Fraser University, Burnaby, Canada)⁴⁸ or 0.5 μM of Thiamet-G (thiazoline amino-ethyl gluco-configured)⁴⁹ resolubilized in DMSO (dimethyl sulfoxide) and diluted in DM, to inhibit OGT and OGA respectively. Control myotubes were cultured in DM with DMSO as vehicle but without OGT or OGA inhibitors. To increase or decrease CamKII activity, we applied overnight 3 mM of caffeine⁵⁰ (Thermofisher) or a co-treatment with 3 mM of caffeine added to 20 μM of KN-93⁵¹ resolubilized in water.

Proteins extraction and fractionation. Cells were rinsed three times with ice-cold PBS (Phosphate Buffer Saline). Proteins were extracted by cells scraping and lysis with 150 μl of extraction buffer adapted to downstream analyses according to specific protocols defined hereinafter. All extraction buffers contained anti-proteases [Complete EDTA-Free (Roche Diagnostics)], anti-phosphatases [Phos-Stop (Roche Diagnostics)] and 50 μM of PUGNAc (*O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyrano-silidene)-amino-*N*-phenyl-carbamate; Sigma), an OGA inhibitor. A recapitulative scheme of all extraction protocols is presented in Fig. 1.

Whole cellular extract. RIPA buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS) was used to get whole extract. Protein content was estimated by Bradford assay.

Cellular extract for kinases and phosphatases assays. For kinase assays, cells were lysed in lysis buffer (20 mM MOPS; 5 mM EGTA; 1% NP40; 1 mM DTT) according to manufacturer's protocol, and after centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, supernatant protein content was determined with BCA assay. For phosphatase assay, RIPA buffer without SDS and phosphatases inhibitors was used to get whole extract. Protein content was estimated by Bradford assay.

Cytoskeletal fraction. Cells were lysed with Cell Lysis Buffer (50 mM PIPES, pH 7.4; 50 mM NaCl; 5% glycerol; 0.1% Triton X-100; 0.1% Tween-20) 1.5 min on ice⁵². The solution was discarded. After rinsing with 300 μl Tris/HCl buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5), 100 μl of nuclease Buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4; 10 mM MgCl_2 ; 2 mM CaCl_2) supplemented with 10 U/ml of benzonase nuclease were applied for 10 min; the solution was discarded too. Cytoskeletal proteins that remained fixed on the plate were rinsed by Tris/HCl buffer and then solubilized by scraping with 30 μl of Tris/HCl buffer supplemented by 1% SDS⁵². Protein content of SDS-resuspended extracts, containing cytoskeletal proteins was estimated by Lowry assay.

Insoluble and soluble fractions. Cells were lysed by Detergent Soluble Buffer (DSB: 50 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100) after 30 min on ice. Protein extract was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ ⁵³. Supernatant corresponds to soluble fraction; pellet, corresponding to insoluble proteins fraction, was resolubilized by 100 μl of Detergent Insoluble Buffer (DIB: 50 mM Tris/HCl, pH 6.8; 2% SDS; 100 mM DTT; 10% glycerol)⁵³. Protein content of DSB extracts was estimated by Bradford assay while those corresponding to DIB extract was estimated by Lowry assay.

Dephosphorylation process. Twenty micrograms of proteins were incubated in dephosphorylation buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6; 100 mM NaCl; 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 ; 1 mM MnCl_2 , added with anti-proteases

[Complete EDTA-Free (Roche Diagnostics)], 10–20 U alkaline phosphatase (Sigma P6774) for 8 h at 37 °C. Then, proteins were denatured by boiling in Laemmli buffer.

Immunoprecipitation. One hundred µg of proteins in RIPA were incubated with protein G coupled on magnetic bead (Millipore) during 1 h at 4 °C for pre-clearing step. The non-retained sample was incubated with primary antibody overnight at 4 °C with gentle agitation, followed by 2 h incubation with magnetic beads (1:5). Beads were then washed sequentially using RIPA, RIPA + 0.5 M NaCl, RIPA + TNE (10 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) (50:50, v/v) and lastly with TNE. Beads were finally resuspended in Laemmli buffer (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8; 10% glycerol; 2% SDS; 5% β-mercaptoethanol; 0.02% bromophenol blue) and boiled during 8 min at 95 °C. The soluble fraction corresponding to the immunoprecipitated proteins was analysed by SDS-PAGE and western-blot as described below.

Electrophoretic methods. *SDS-PAGE.* Proteins samples were separated by SDS-PAGE on 7.5% Stain-free acrylamide or AnykD Mini-PROTEAN TGX Stain-free (SF) Precast Gels (Biorad). The electrophoretic separation was done at constant voltage (300 V) for about 20 min in a tank with migration buffer (190 mM Glycine; 25 mM Tris Base; 0.1% SDS). At the end of the electrophoretic separation, total proteomes were visualized after UV activation with ChemiDoc MP Imager (Imaging System) and ImageLab software (Biorad) by means of the Stain-Free technology. It is based on trihalo compound incorporation in the gel, which reacts with proteins and covalently binding to tryptophan residues, rendering them detectable after UV exposure. Proteins were then transferred on 0.2 µm nitrocellulose membrane using Trans-blot Turbo transfer system (Biorad) at 1.3 A, up to 25 V/gel during 10 min. The quality of transfer was checked by imaging of the SF profile with ChemiDoc MP Imager.

Phos-tag-PAGE. Proteins samples were resolved on Phos-tag-PAGE gel^{54,55}, composed of stacking gel (4% acrylamide/bisacrylamide [29:1]; 125 mM Tris/HCl, pH 6.8; 0.01% SDS; 0.06% APS 10%; 0.034% TEMED) and resolving gel (7.5% acrylamide/bisacrylamide [29:1]; 375 mM Tris/HCl pH 8.8; 0.01% SDS; 10 mM MnCl₂; 20 µM Phos-tag™ acrylamide [AAL-107, NARD Institute]; 0.5% APS 10%; 0.1% TEMED). Electrophoretic migration was performed using migration buffer as described above at constant amperage (25 mA/gel) for about 110 min. After migration, Phos-tag gels were incubated twice for 7 min in transfer buffer (20% ethanol; 20% Transfer buffer 5 × [Trans-blot turbo, Biorad]) supplemented with 1 mM EDTA, and then two times in transfer buffer without EDTA. Finally, proteins were transferred on 0.2 µm PVDF membrane with Trans-blot Turbo transfer system as described above. The quality of transfer was checked by imaging using the ChemiDoc MP Imager after membrane staining with red Ponceau (ThermoFisher).

Western-blot. Membranes were blocked with 5% BSA for RL-2, CamKII and P-CamKII antibodies or non-fat dry milk for desmin, PAK1 and P-PAK1/2 antibodies in TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween: 15 mM Tris/HCl, pH 7.6; 140 mM NaCl; 0.05% Tween-20). Membranes were incubated with primary antibody as follow: RL-2 (MA1-072, ThermoFisher) at 1/2500°; Desmin (Abcam ab6322) at 1/50000°; CamKII (Cell Signaling #4436) at 1/1000°; P-CamKII (Thr286) (Cell Signaling #12716) at 1/1000°; PAK1 (Cell Signaling #2602) at 1/1000°; P-PAK1/2 (Ser144/Ser141) (Cell Signaling #2606) at 1/1000° in blocking solution overnight at 4 °C with gentle agitation. After three washes of 10 min in TBS-T, membranes were incubated in blocking solution containing secondary antibodies (HRP-linked IgG, Cell Signaling #7074 or #7076) for 1 h at RT before five washes of 10 min each in TBS-T. Signals were detected by chemiluminescence using ECL Clarity (Biorad) and ChemiDoc MP. Images were acquired and analysed using Image Lab® software.

Kinases and phosphatases activity assay. *PKA and PKC activities assay.* The activity of PKA and PKC were measured using PKA and PKC activity assay kits (Abcam 139435 and 139437, respectively) according to the manufacturer's protocol. Once proteins extracted according to the protocol defined for kinases assays, 1 µg of protein extract was used for ELISA assay based on a specific phospho-peptide substrate which was phosphorylated by active PKA or PKC. The phosphorylation level of peptide substrate was determined by absorbance measurement at 450 nm on SpectraMax reader (Molecular devices).

In-gel phosphatase assay. The phosphatases activities were in-gel assayed using the fluorogenic substrate MUP (4-methyl-umbelliferyl phosphate), MUP being converted to fluorescent products once hydrolysed by phosphatase(s)^{56,57}. Native-PAGE was performed with 75 µg proteins extracted using the same procedure than SDS-PAGE except that SDS was removed from RIPA buffer, Laemmli buffer, migration buffer, 10% acrylamide/bisacrylamide [37.5:1] separating gel and 4% stacking gel. The electrophoretic separation was done under constant amperage (20 mA/gel) at 4 °C to prevent loss of phosphatase activity for about 110 min. Once the electrophoretic separation was achieved, the native gels were incubated in reaction mixture (50 mM Tris/HCl, pH 8; 0.1 mM EGTA; 0.01% Tween 20; 20 mM β-mercaptoethanol; 20 mM MnCl₂; 0.5 mM MUP at 10 mM in DMSO) for 15 min at 37 °C with manual shaking every minute as previously described^{56,57}. Fluorescent bands corresponding to phosphatases activity were detected after UV exposition (365 nm) using ChemiDoc MP.

Statistical analysis. The quantification of signal intensities was carried out following normalization by total protein level on Stain-Free images or by internal standards. Means of each group were related to the corresponding control mean having the value of 1. The significance of intergroup differences was determined by Kruskal–Wallis test (GraphPad Prism software). Experiments were done on 5 dishes per culture, on 3 independ-

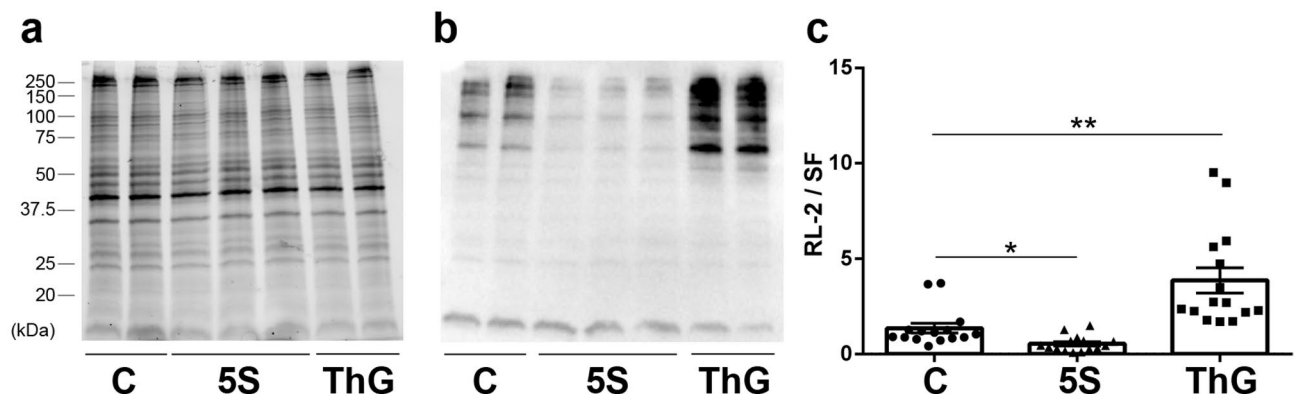


Figure 2. Quantification of global O-GlcNAcylation level in C2C12 myotubes following Ac₄-5S-GlcNAc (5S, ▲) or Thiamet G (ThG, ■) treatment. Twenty µg of proteins sample extracted with RIPA buffer were resolved on 7.5% acrylamide Stain-free gels and analysed by western blot. (a) Whole protein profiles detected using Stain-Free technology. (b) O-GlcNAcylation pattern revealed with RL-2 antibody. (c) Quantification of western blot signals, normalized to Stain-Free profile. Data were expressed as mean ± SEM and compared with the control condition. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 significantly different from control (n = 15, N = 3 independent cultures). Uncropped images of gel and blot are presented in Supplemental data.

ent cultures (n = 15, N = 3) and samples were distributed on several gels performed in parallel. Results were presented as mean ± SEM and outlier values were removed when existing. Significance levels were indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01 or ****p* < 0.001.

Results

Modulation of O-GlcNAcylation global level. To better understand the phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay on desmin, the global O-GlcNAcylation level was modified in 5-days differentiated C2C12 myotubes using pharmacological molecules. Thiamet G⁴⁸ and Ac₄-5S-GlcNAc⁴⁹, OGA and OGT inhibitors, were used to increase and decrease the global O-GlcNAcylation level. For each treatment, we determined the differentiation status (fusion index) and cell viability (colorimetric MTT assay) which were not altered whatever the treatment applied (Supplemental Fig. 1).

To quantify changes of the global O-GlcNAcylation level, we performed western blot using RL-2 antibody which recognizes O-GlcNAc moieties; whole protein profiles (Stain-Free) and RL-2 profiles were presented on Fig. 2a,b, respectively. The quantification of the variation of global O-GlcNAcylation level was presented on Fig. 2c. As shown on Fig. 2, Ac₄-5S-GlcNAc treatment led to a significant decrease of O-GlcNAcylation level (0.54 ± 0.11 , *p* < 0.05) while Thiamet G treatment significantly increased the O-GlcNAcylation level (3.87 ± 0.66 , *p* < 0.01) compared to control cells (1.00 ± 0.26).

Modulation of desmin partition between soluble and insoluble fractions and towards cytoskeleton. The desmin protein level was quantified in the whole proteome (Fig. 3a). While the Thiamet G treatment didn't impact the desmin protein level compared with control (0.99 ± 0.07), its protein level increased significantly in the whole extract following a global O-GlcNAcylation decreased resulting from Ac₄-5S-GlcNAc (1.37 ± 0.13 , *p* < 0.05).

Myotubes proteins were extracted according to two differential extraction protocols permitting to access to soluble and insoluble protein fractions or to cytoskeleton, as described in Fig. 1. The different proteins patterns and the validation of differential extraction were presented on Supplemental Fig. 2. The partition of desmin investigated by western blot performed on insoluble fraction and on cytoskeletal proteins was modified consecutively to global O-GlcNAcylation changes. Figure 3b showed that Thiamet G treatment significantly decreased the partition of desmin toward cytoskeleton (0.67 ± 0.06 , *p* < 0.05) compared to control (1.00 ± 0.11) while this treatment didn't modify desmin partition into the insoluble fraction (Fig. 3c). The Ac₄-5S-GlcNAc treatment slightly increased desmin in insoluble fraction (1.23 ± 0.10 , *p* = 0.1) compared to control (0.94 ± 0.07) (Fig. 3c); however, it didn't cause any change of desmin partition toward cytoskeleton (Fig. 3b).

Phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay of desmin. The variation of phosphorylation level was performed using a gel electrophoresis approach based on Phos-tag-PAGE^{54,55}, permitting the retardation of the different phosphorylated forms of a protein compared to the non-phosphorylated one; the protein of interest was then detected by western-blot. As indicated on Fig. 4a, the non-retarded band (assigned as NP band) corresponded to the non-phosphorylated form of desmin in whole protein extract. The retarded bands were assigned to P1 and P2, corresponding to the first and the more retarded band, respectively. In order to validate this retardation as phosphorylated forms of desmin comparing with the non-phosphorylated one, a control sample was dephosphorylated using alkaline phosphatase prior to Phos-tag-PAGE (Fig. 4c).

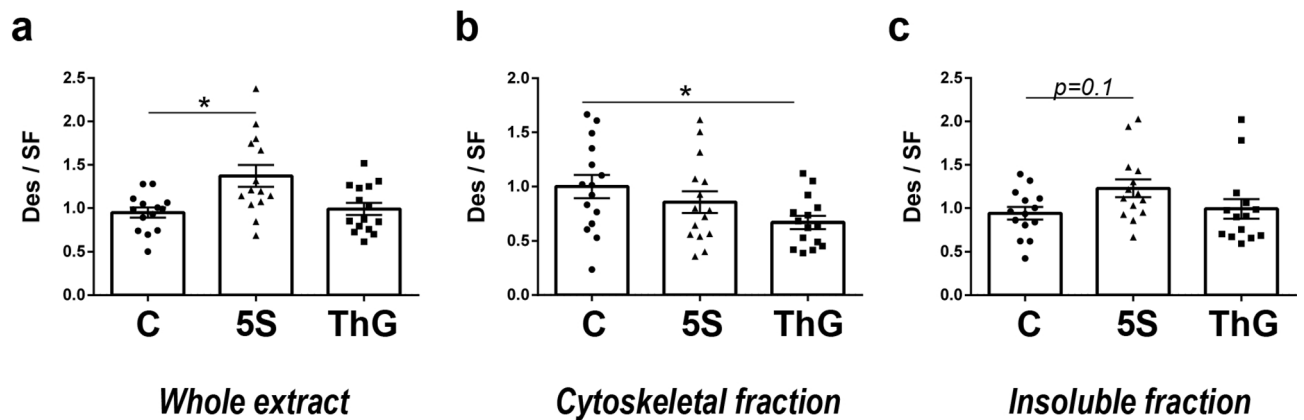


Figure 3. Quantification of desmin partition toward cytoskeleton or insoluble protein material. Twenty μg of proteins sample extracts (RIPA for desmin protein expression, and SDS-resolubilized extracts or DIB for partition toward cytoskeleton or insoluble material, respectively) were resolved on AnykD Stain-free gels and analysed by western blot for desmin detection. (a) Desmin protein level in whole proteome. (b,c) Changes in desmin partition towards cytoskeleton (b) or insoluble protein material (c) from untreated (C, ●), $\text{Ac}_4\text{-5S-GlcNAc}$ - and Thiamet G-treated myotubes (5S, ▲ and ThG, ■ respectively). Data were expressed as mean \pm SEM and compared with the control condition. * $p < 0.01$: significantly different from control ($n = 15$; $N = 3$ independent cultures).

All signals were quantified, and each band was expressed as relative percentage compared with the sum of each signal (NP, P1 and P2) that corresponds to whole desmin protein level. Data were represented on Fig. 4b. We showed that the increase of global O-GlcNAcylation level through the Thiamet G treatment of myotubes led to a change in its global level of phosphorylation (Fig. 4b) which was characterized by a significant decrease of the most retarded form (band P2) (8.58% versus 14.36% for control, $p < 0.01$) (Fig. 4b). We didn't quantify any change for the non-phosphorylated form (NP), nor any difference in the phosphorylation pattern in $\text{Ac}_4\text{-5S-GlcNAc}$ myotubes.

We also studied the protein pattern of the protein extracts resulting from the differential extraction protocols using Phos-tag-PAGE. As shown on Fig. 4d, several phosphorylated forms of desmin could be detected on cytoskeletal or on insoluble fractions. In contrast, a very slight signal corresponding to phosphorylated desmin was detected on soluble fraction, supporting that phosphorylation impacts the partition of desmin towards insoluble fraction or towards cytoskeleton. In addition, we observed additional bands in the insoluble and cytoskeleton fractions that were not detected in the whole extract. This suggests that phosphorylation status on desmin partition toward specific protein fraction such as cytoskeleton plays a crucial role.

Modulation of desmin O-GlcNAcylation. We performed western-blot directed against desmin following immunoprecipitation of O-GlcNAcylated proteins using RL-2 antibody as previously described in previous papers of the lab^{39,47}. This approach allowed to determine that desmin O-GlcNAcylation slightly decreased in whole extract after Thiamet G treatment (0.60 ± 0.11 , $p = 0.06$) compared to control (0.93 ± 0.11) (Fig. 5a) while it didn't change following the $\text{Ac}_4\text{-5S-GlcNAc}$ treatment.

To clarify the link between phosphorylation and O-GlcNAcylation of desmin, we immuno-precipitated O-GlcNAcylated proteins from whole protein extract of control C2C12 myotubes prior to Phos-tag-PAGE; desmin detection was carried out by western blot. As shown on Fig. 5b, our data indicated that the O-GlcNAcylated desmin was not phosphorylated as no retarded bands were observed after RL-2 immunoprecipitation (Fig. 5b, left lane) while we detected two retarded forms in the whole extract (Fig. 5b, right lane). These data suggest that the two post-translational modifications are mutually exclusive for desmin.

Analysis without an a priori of phosphatases activity that could be involved in the variation of desmin phosphorylation.

To go further in understanding the complex phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay, we analysed the activity of phosphatases that could be involved in desmin dephosphorylation. Indeed, a modulation of the phosphorylation of a given protein could result from a modulation of kinase(s) activity but also phosphatase(s) activity. To identify without a priori the phosphatases presenting a change in their activity, we performed an in-gel protein phosphatase assay using 4-methyl-umbelliferyl phosphate substrate (MUP) (Fig. 6a)⁵⁷. This approach allowed us to determine that there was no changes of global phosphatases activity whatever the treatment applied (Fig. 6b); in the same way, we didn't observe any change for each separated band (Supplemented Fig. 3).

Identification of kinase(s) involved in the variation of desmin phosphorylation. We have demonstrated in the herein paper that increased O-GlcNAcylation level led to a significant decrease of desmin phosphorylation without alteration of phosphatases activity. To go further in the fine understanding of the inter-

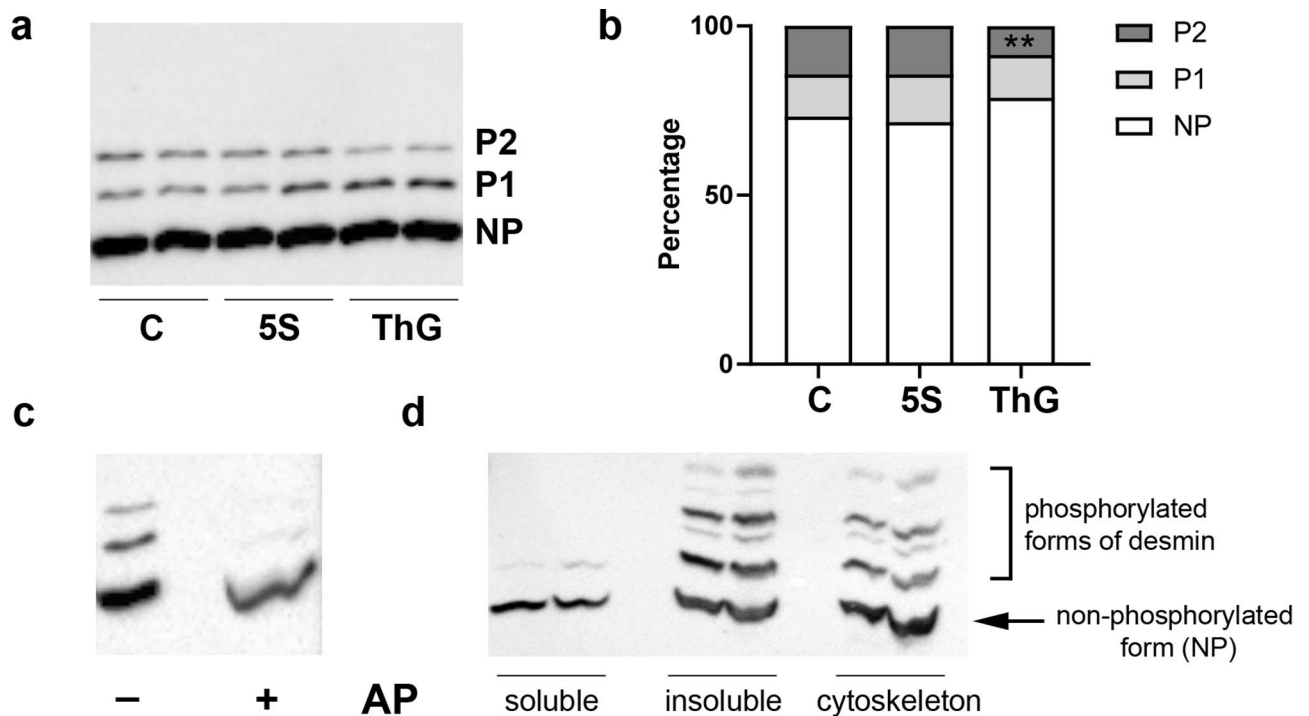


Figure 4. Quantification of the phosphorylated forms of desmin in C2C12 differentiated myotubes consecutively to global O-GlcNAcylation variations. Twenty μg of whole proteins samples (RIPA extracts) or protein samples resulting from differential extractions (DSB: soluble; DIB: insoluble; and SDS-resolubilized: cytoskeleton) were separated using Phos-tag-PAGE, and desmin was detected using western blot. **(a,b)** Quantification of desmin phosphorylation changes in whole protein extract of untreated (C), $\text{Ac}_4\text{-5S-GlcNAc}$ - and Thiamet G-treated myotubes (5S, and ThG respectively). The phosphorylated forms of desmin were separated according to the number of phosphate groups (P1: first retarded form of desmin; P2: second retarded form of desmin) comparing with the non-phosphorylated form of desmin (NP); the representative pattern in untreated and treated myotubes was presented on **(a)** panel. The signals were quantified and expressed as the relative percentage of each form (NP, P1 and P2 forms, comparing with the sum of all forms (NP + P1 + P2, equal to 100%, for each condition). **(c)** A control sample was dephosphorylated using alkaline phosphatase (AP) prior to Phos-tag-PAGE and detection of desmin was carried out through western blot. **(d)** Protein samples resulting from differential extractions (DSB: soluble; DIB: insoluble; and SDS-resolubilized: cytoskeleton) were separated using Phos-tag-PAGE, and detection of desmin was carried out through western blot. $**p < 0.01$: significantly different from control ($n = 15$; $N = 3$ independent cultures). Uncropped images of blots are presented in Supplemental data.

play between phosphorylation and O-GlcNAcylation, we attempted to determine the kinase(s) involved in this decrease of phosphorylation level. We quantified PKA and PKC activities using ELISA approach and we determined the activation status of CamKII and PAK using the phosphorylation level of these enzymes, which is known to lead to their activation; the representative signals for CamKII, P-CamKII, PAK1 and P-PAK1/2 were presented in Supplemental Fig. 4.

As shown on Fig. 7a, the PKA activity increased consecutively to global decrease of O-GlcNAcylation level in $\text{Ac}_4\text{-5S-GlcNAc}$ -treated myotubes (1.20 ± 0.06 , $p < 0.001$) compared to control (0.99 ± 0.01), while its activity was unmodified following the increase of global O-GlcNAcylation level in Thiamet-G-treated myotubes. The PKC activity was not modified whatever the variation of the global O-GlcNAcylation level (Fig. 7b). Interestingly, our data showed that the global increase of O-GlcNAcylation consecutively to Thiamet G treatment led to a significant decrease of CamKII phosphorylation (0.55 ± 0.06 , $p < 0.001$) compared to control (1.00 ± 0.06), translating a decrease in its activation level (Fig. 7c). This data could explain the decrease of desmin phosphorylation we quantified in Thiamet G-treated myotubes. Lastly, we determined whether the activation status of PAK could be impacted by global O-GlcNAcylation level variation. However, we didn't quantify any change of activation status of PAK (Fig. 7d). Interestingly, when CamKII activity was modified consecutively to co-treatment with caffeine (CamKII activator) and KN-93 (CamKII inhibitor), we observed a decrease in the P2 signal (3.36% versus 13.33% for control, $p < 0.001$) on Phos-Tag PAGE while the P1 signal slightly increased (16.44% versus 10.05% for control, $p = 0.09$) (Fig. 8). The non-phosphorylated (NP) signal remained unchanged. These data supported that CamKII could be involved in the regulation of the desmin phosphorylation level.

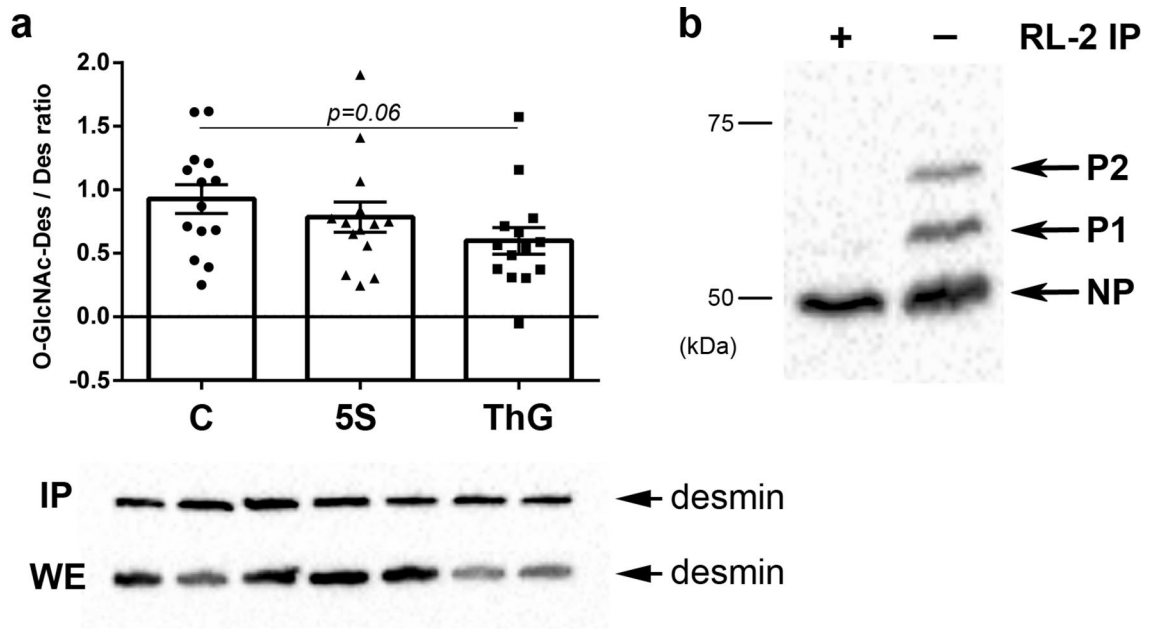


Figure 5. Quantification of desmin O-GlcNAcylation and its interplay with phosphorylation. Changes of desmin O-GlcNAcylation level were determined in whole extract by western blot analysis performed after immunoprecipitation of O-GlcNAcyated proteins from untreated myotubes (C, ●), and Ac_4 -5S-GlcNAc- and Thiamet G-treated myotubes (5S, ▲ and ThG, ■ respectively). (a) Signals were quantified and expressed as ratio of glycosylated protein/protein level (mean \pm SEM), and compared to the control condition. The representative signals for whole extract (WE) and the immunoprecipitated proteins (IP) were shown under the histogram. (b) Desmin was detected using western blot following Phos-tag-PAGE after immunoprecipitation of O-GlcNAcyated proteins (left lane) comparing with the whole protein extract from untreated C2C12 myotubes (right lane). NP corresponded to the non-phosphorylated desmin, and P1 and P2 the phosphorylated forms of desmin. The tendency of difference comparing with control is indicated on histogram ($n=15$; $N=3$ independent cultures). Uncropped images of blots are presented in Supplemental data.

Discussion

In the herein paper, we determined whether the O-GlcNAcylation level modulation could impact desmin behaviour in C2C12 myotubes. For this purpose, O-GlcNAcylation level was pharmacologically modulated with specific inhibitors of OGT and OGA (the Ac_4 -5S-GlcNAc⁴⁸ and the Thiamet-G⁴⁹, respectively). Our data support that O-GlcNAcylation impacts desmin protein level, its phosphorylation and O-GlcNAcylation as well as its subcellular distribution (see recapitulative Table 1). Interestingly, while we expected an opposite impact of the two inhibitors, we observed differential changes of desmin behaviour according to global O-GlcNAcylation variations. This suggests that targeted inhibition of OGT or OGA led to differential adaptive response of myotubes. Indeed, when global O-GlcNAcylation level decreased following Ac_4 -5S-GlcNAc treatment, we showed an increase of desmin protein level that was preferentially found into the insoluble fraction. In contrast, the desmin protein level remained unmodified when O-GlcNAcylation was increased following Thiamet G treatment; however, the partition of desmin toward cytoskeleton decreased, suggesting that O-GlcNAcylation could be involved in cytoskeleton remodelling.

Another important finding is that global O-GlcNAcylation impacts desmin phosphorylation. Indeed, while the Ac_4 -5S-GlcNAc had no effect on desmin phosphorylation, the increase of global O-GlcNAcylation level through Thiamet G treatment led to a decrease of desmin phosphorylation. Phosphorylation/dephosphorylation is a central process that modulates the IFs dynamics and function. Per se, phosphorylation dictates the intrinsic properties of IFs such as filament organization, turnover, binding with associated proteins or solubility. It could particularly impact the redistribution between soluble pool and filamentous and insoluble material⁵⁸. However, the phosphorylation process on desmin is highly complex, depending on several kinases that link desmin to several cellular processes¹⁸. In vitro phosphorylation of the desmin head domain is often described to contribute to IFs solubilisation⁵⁹, but in contrast, phosphorylation, and more specifically hyperphosphorylation, is closely linked to the physiopathology of skeletal muscle diseases (in particular myofibrillar myopathies) or in heart disorders (such as heart failure), characterized by desmin aggregation^{24,28,29,60–62}.

While the decrease of the phosphorylation level was correlated with a decrease of the partition of desmin toward cytoskeleton, we investigated whether desmin could be differentially phosphorylated in cytoskeletal or in soluble/insoluble fractions. We thus analysed the phosphorylated pattern of desmin in each of these fractions using Phos-tag-PAGE^{39,54,55}; this approach was previously applied to analyse the pattern of phosphorylation of desmin in cardiomyocytes and heart tissue^{24,28,62,63}. However, to our knowledge, this approach was applied for the first time in skeletal muscle cells considering cytoskeleton and soluble/insoluble material. The result obtained was

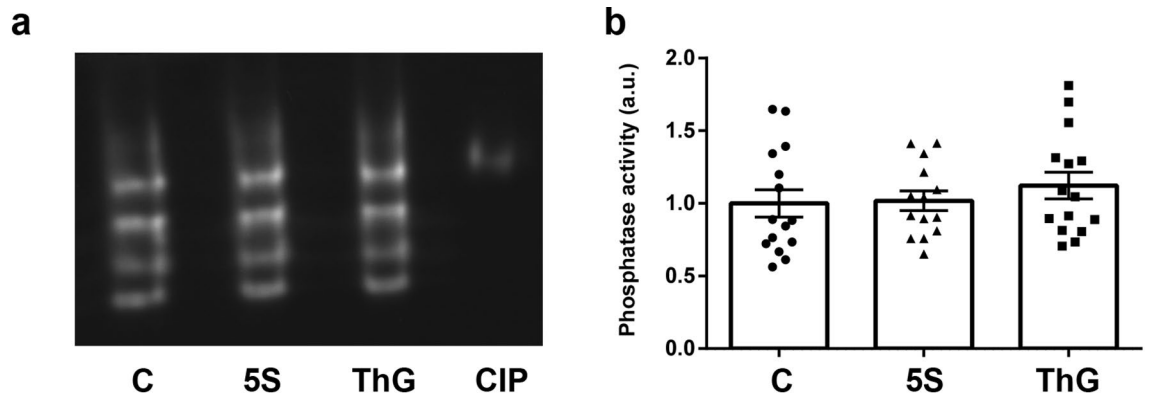


Figure 6. Quantification without an a priori of phosphatase activities involved in the desmin dephosphorylation. (a) In-gel detection of phosphatases activity after separation of 75 μ g of proteins extracted from untreated myotubes (C, ●), and Ac₄-5S-GlcNAc- and Thiamet G-treated myotubes (5S, ▲ and ThG, ■ respectively) using 10% Native-PAGE; MUP was used as phosphatase substrate, leading to fluorescence emission once hydrolysed by phosphatases. The Calf Intestine Phosphatase (CIP, 1 mU) was used as positive control. (b) Quantification of total phosphatases activities. Resulting signals were quantified, expressed as mean \pm SEM and compared with the control condition (n = 15; N = 3 independent cultures). Uncropped image of gel is presented in Supplemental data.

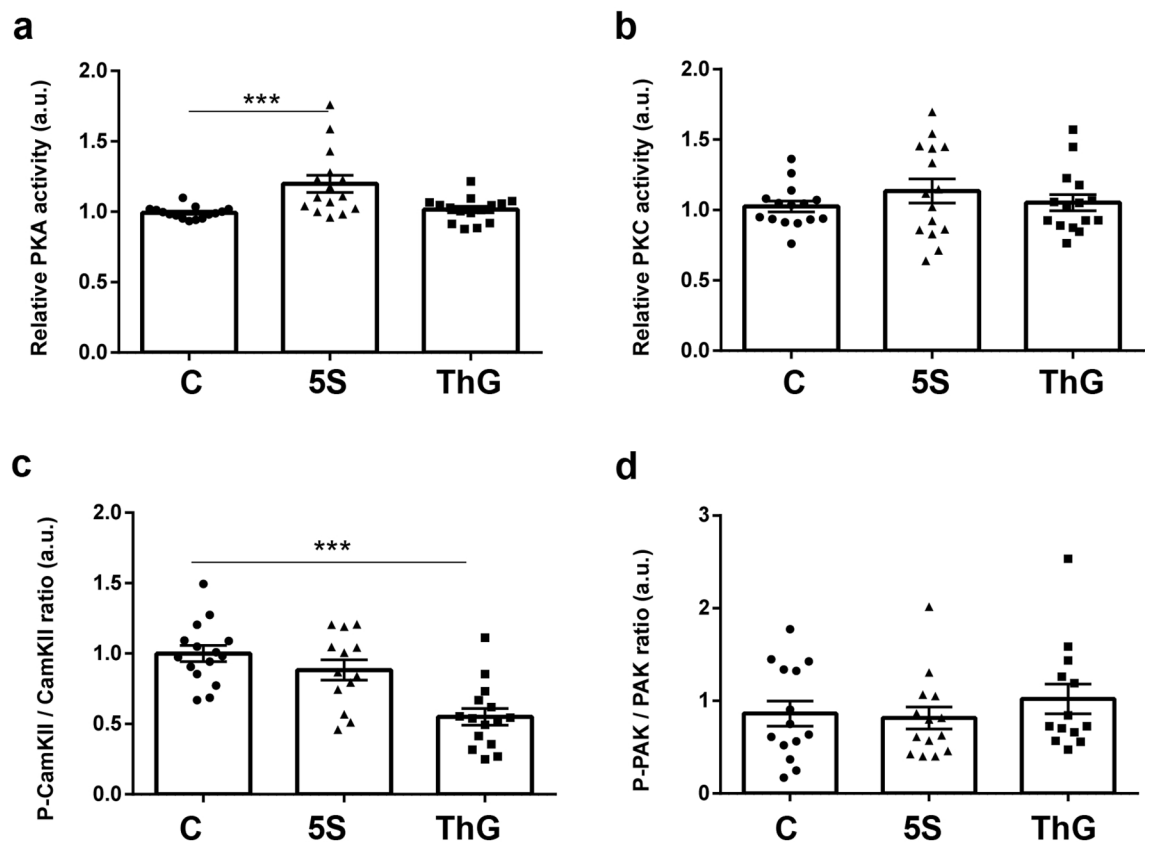


Figure 7. Quantification of the activity/activation status of the major kinases involved in the desmin phosphorylation. The PKA and PKC activities were assayed by ELISA, while activation status of CamKII and PAK was investigated by western blot. (a,b) Quantification of PKA (a) and PKC (b) activities. (c,d) Quantification of the phosphorylation status of CamKII (c) and PAK (d), the phosphorylation level translating their activation status. The signals intensity of phospho-CamKII and phospho-PAK were normalized according to the expression level of CamKII and PAK, and expressed as phosphorylated signal/whole signal ratio. Data were expressed as mean \pm SEM and compared with the control condition. ***p < 0.001: significantly different from control. (n = 15; N = 3 independent cultures).

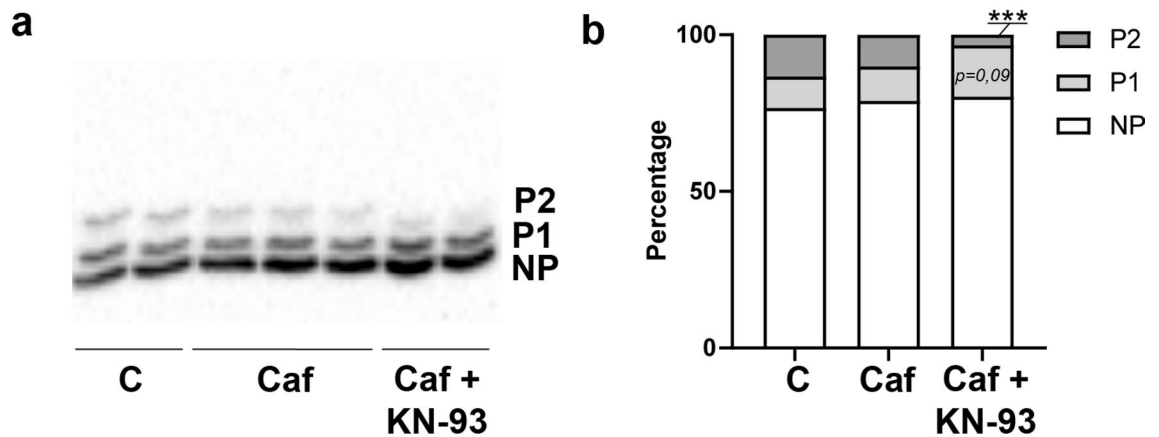


Figure 8. Quantification of the phosphorylated forms of desmin in C2C12 differentiated myotubes consecutively to co-treatment caffeine and KN-93, CamKII activator and inhibitor, respectively. Twenty μg of the whole proteins samples were separated using Phos-tag-PAGE, and desmin was detected using western blot. (a) Visualization of phosphorylated pattern of desmin in untreated (C), caffeine (Caf) and caffeine + KN-93 (Caf + KN-93) treated myotubes. The phosphorylated forms of desmin were separated according to the number of phosphate groups (P1: first retarded form of desmin; P2: second retarded form of desmin) comparing with the non-phosphorylated form of desmin (NP). (b) The signals were quantified and expressed as the relative percentage of each form (NP, P1 and P2 forms, comparing with the sum of all forms (NP + P1 + P2, equal to 100%, for each condition). *** $p < 0.001$: significantly different from control ($n = 15$; $N = 3$ independent cultures). Uncropped image of blot is presented in Supplemental data.

intriguing since we observed a highly complex pattern of phosphorylation in insoluble material and in cytoskeleton; in parallel, we observed only one phosphorylated form of desmin in soluble fraction. These data suggest that phosphorylation, through a specific and complex pattern, could be involved in the organization of desmin IFs and not only in their disassembly. It is worth to note that a similar observation was previously done on vimentin, another type III intermediate filament protein. Indeed, it was observed that in contrast with phosphorylation by most other kinases, vimentin phosphorylation by MAPKAP kinase-2 seems to have no effect on its assembly⁶⁴.

In parallel to phosphorylation, we observe a slight decrease of desmin O-GlcNAcylation following Thiamet G treatment, while O-GlcNAcylation and phosphorylation seems to be mutually exclusive on desmin. We have demonstrated that desmin is one of the substrates of OGT^{30,44}, but the function of the glycosylation remains undefined. The O-GlcNAcylation of IFs was previously described on the type III IFs vimentin⁷, and occurs essentially in the head domain^{6,33,65}. It was shown that O-GlcNAcylation of vimentin might block filament disassembly³³ and is required for vimentin IF morphology and cell migration⁶. However, the only one site identified to date on desmin corresponds to Ser459⁴⁴, i.e. in the tail domain, suggesting thus that O-GlcNAc could exert other functions than those expected. Of course, we cannot exclude that other O-GlcNAc site(s) may modify desmin; it should be interesting to go further in the characterization of the role of O-GlcNAcylation on desmin, in particular through the identification of additional modified sites.

Furthermore, the interplay between phosphorylation and O-GlcNAcylation was firstly mentioned in 1987⁶⁶, since then, this interplay was extensively described on a large panel of proteins (for review, see^{31,67–69}). Interestingly, it was also described that O-GlcNAcylation modulates kinome and phosphatome^{70–72}. In addition, it was shown that OGT and OGA interact with kinases and phosphatases within multienzymatic complexes permitting the phosphorylation and/or O-GlcNAcylation of proteins of interest^{33,39}. To explain the desmin phosphorylation change, we investigated whether or not kinases and phosphatases activity could be modified consecutively to OGT or OGA inhibition. The decrease of phosphorylation level could result from a decrease of kinase(s) activity and/or an increase in phosphatase(s) activity. Therefore, we applied a strategy without a priori to measure phosphatases activity^{56,57} and we didn't quantify any changes in the activity of phosphatases. In parallel, we have selected the major kinases involved in desmin phosphorylation, i.e. PKA, PKC, PAK and CamKII¹⁸ and we determined that two kinases presented a variation of their activity and/or activation status. Thus, PKA was activated following the decrease of O-GlcNAc level (i.e. Ac₄-5S-GlcNAc treatment); however, desmin phosphorylation remained unmodified. In contrast, the CamKII activation status decreased in Thiamet G-treated myotubes. This data suggest that the desmin phosphorylation decrease could result from a decrease of CamKII activity consecutively to global O-GlcNAcylation increase.

However, caffeine and the subsequent activation of CamKII by calcium didn't modify phosphorylation of desmin. In contrast, we observed a decrease of desmin phosphorylation when CamKII was inhibited by KN-93, more specifically on the phosphoform that was modified after Thiamet G treatment. Interestingly, some data argue in favour of a modulation of the activation of CamKII through interactions with proteins partners such as α -actinin in a calcium-independent manner^{73,74}. In this way, we previously observed that the interaction between α -actinin and protein partners was modulated consecutively to O-GlcNAcylation changes⁴⁷. This data suggests that the modulation of CamKII activity could be much more intricate than those initially expected.

	Ac ₄ -5S-GlcNAc-treated myotubes	Thiamet G-treated myotubes	Corresponding figure
Global O-GlcNAcylation level	↘*	↗**	Figure 2
Desmin protein level	↗*	=	Figure 3a
Partition			
Cytoskeleton	=	↘*	Figure 3b
Insoluble	↗~	=	Figure 3c
Desmin O-GlcNAcylation	=	↘~	Figure 5
Desmin phosphorylation	=	↘**	Figure 4
Phosphatases activity	=	=	Figure 6 + S3
Kinases activity			
PKA	↗***	=	Figure 7a
PKC	=	=	Figure 7b
CamKII	=	↘***	Figure 7c + S4a
PAK	=	=	Figure 7d + S4b

Table 1. Recapitulative table of desmin behaviour in Ac₄-5S-GlcNAc- and Thiamet G-treated myotubes, leading to a decrease and increase of global O-GlcNAcylation level, respectively. In this table the changes of desmin protein level and partition of desmin towards cytoskeleton and insoluble materials were represented. The variations of desmin O-GlcNAcylation and phosphorylation were also considered, as well as the kinases and phosphatases activities. Variations were compared with control myotubes. Significance levels were indicated by *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, or ~ for 0.05 < p < 0.1.

To sum, we have demonstrated in the herein paper that global O-GlcNAcylation increase led to a decrease of the desmin partition towards cytoskeleton correlated to a decrease of its phosphorylation that could result from a change of CamKII activity. Our data support the fact that the subcellular localization of desmin could be finely regulated by its PTMs signature in a spatio-temporal way involving O-GlcNAcylation. It should be thus essential to clarify the PTMs signature of desmin to fully understand the fine regulation of its functions and how this signature could be changed in the physiopathology of striated muscle disorders.

Data availability

The data and methods presented in the herein paper will be made available to other researchers upon reasonable request for purposes of reproducing the results or replicating the procedure.

Received: 9 February 2022; Accepted: 31 May 2022

Published online: 14 June 2022

References

- Etienne-Manneville, S. Cytoplasmic intermediate filaments in cell biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **34**, 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062534> (2018).
- Schwarz, N. & Leube, R. E. Intermediate filaments as organizers of cellular space: How they affect mitochondrial structure and function. *Cells* **5**, 30. <https://doi.org/10.3390/cells5030030> (2016).
- Mado, K. *et al.* On the role of tubulin, plectin, desmin, and vimentin in the regulation of mitochondrial energy fluxes in muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **316**, C657–C667. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2018> (2019).
- Sanghvi-Shah, R. & Weber, G. F. Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, 81. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00081> (2017).
- Srikanth, B., Vaidya, M. M. & Kalraiyi, R. D. O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *J. Biol. Chem.* **285**, 34062–34071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098996> (2010).
- Tarbet, H. J. *et al.* Site-specific glycosylation regulates the form and function of the intermediate filament cytoskeleton. *Elife* **7**, e31807. <https://doi.org/10.7554/eLife.31807> (2018).
- Snider, N. T. & Omary, M. B. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: Mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 163–177. <https://doi.org/10.1038/nrm3753> (2014).
- Dey, P., Togra, J. & Mitra, S. Intermediate filament: Structure, function, and applications in cytology. *Diagn. Cytopathol.* **42**, 628–635. <https://doi.org/10.1002/dc.23132> (2014).
- Pallari, H. M. & Eriksson, J. E. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* **2006**, e53. <https://doi.org/10.1126/stke.3662006pe53> (2006).
- Cheng, F. & Eriksson, J. E. Intermediate filaments and the regulation of cell motility during regeneration and wound healing. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a022046. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022046> (2017).
- Hyder, C. L., Isoniemi, K. O., Torvaldson, E. S. & Eriksson, J. E. Insights into intermediate filament regulation from development to ageing. *J. Cell Sci.* **124**, 1363–1372. <https://doi.org/10.1242/jcs.041244> (2011).
- Henderson, C. A., Gomez, C. G., Novak, S. M., Mi-Mi, L. & Gregorio, C. C. Overview of the muscle cytoskeleton. *Compr. Physiol.* **7**, 891–944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033> (2017).
- Hnia, K., Ramsbacher, C., Vermot, J. & Laporte, J. Desmin in muscle and associated diseases: Beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2016-4> (2014).
- Tsikitis, M., Galata, Z., Mavroidis, M., Psarras, S. & Capetanaki, Y. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophys. Rev.* **10**, 1007–1031. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0443-2> (2018).

15. Koutakis, P. *et al.* Abnormal accumulation of desmin in gastrocnemius myofibers of patients with peripheral artery disease: Associations with altered myofiber morphology and density, mitochondrial dysfunction and impaired limb function. *J. Histochem. Cytochem* **63**, 256–269. <https://doi.org/10.1369/0022155415569348> (2015).
16. Capetanaki, Y., Papathanasiou, S., Diokmetzidou, A., Vatsellas, G. & Tsikitis, M. Desmin related disease: A matter of cell survival failure. *Curr. Opin. Cell Biol* **32**, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.004> (2015).
17. Winter, L. *et al.* Imbalances in protein homeostasis caused by mutant desmin. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **45**, 476–494. <https://doi.org/10.1111/nan.12516> (2019).
18. Winter, D. L., Paulin, D., Mericskay, M. & Li, Z. Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies. *Histochem. Cell Biol.* **141**, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1148-z> (2014).
19. Shah, F. *et al.* Desmin and dystrophin abnormalities in upper airway muscles of snorers and patients with sleep apnea. *Respir. Res.* **20**, 31. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-0999-9> (2019).
20. Brodehl, A., Gaertner-Rommel, A. & Milting, H. Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. *Biophys. Rev.* **10**, 983–1006. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0429-0> (2018).
21. Mohamed, J. S., Hajira, A., Li, Z., Paulin, D. & Boriek, A. M. Desmin regulates airway smooth muscle hypertrophy through early growth-responsive protein-1 and microRNA-26a. *J. Biol. Chem.* **286**, 43394–43404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.235127> (2011).
22. Dalakas, M. C. *et al.* Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N. Engl. J. Med.* **342**, 770–780. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003163421104> (2000).
23. Panagopoulou, P. *et al.* Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *J. Cell Biol.* **181**, 761–775. <https://doi.org/10.1083/jcb.200710049> (2008).
24. Bouvet, M. *et al.* Increased level of phosphorylated desmin and its degradation products in heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Rep.* **6**, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.02.014> (2016).
25. Delort, F. *et al.* Alterations of redox dynamics and desmin post-translational modifications in skeletal muscle models of desminopathies. *Exp. Cell Res.* **383**, 111539. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111539> (2019).
26. Kedra, N. *et al.* Desmin forms toxic, seeding-competent amyloid aggregates that persist in muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 16835–16840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908263116> (2019).
27. Singh, S. R. & Robbins, J. Desmin and cardiac disease: An unfolding story. *Circ. Res.* **122**, 1324–1326. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312965> (2018).
28. Agnetti, G. *et al.* Desmin modifications associate with amyloid-like oligomers deposition in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **102**, 24–34. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu003> (2014).
29. Rainer, P. P. *et al.* Desmin phosphorylation triggers preamyloid oligomers formation and myocyte dysfunction in acquired heart failure. *Circ. Res.* **122**, e75–e83. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312082> (2018).
30. Cieniewski-Bernard, C., Montel, V., Berthoin, S. & Bastide, B. Increasing O-GlcNAcylation level on organ culture of soleus modulates the calcium activation parameters of muscle fibers. *PLoS One* **7**, e48218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048218> (2012).
31. van der Laarse, S. A. M., Leney, A. C. & Heck, A. J. R. Crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAcylation: Friend or foe. *FEBS J.* **285**, 3152–3167. <https://doi.org/10.1111/febs.14491> (2018).
32. Farach, A. M. & Galileo, D. S. O-GlcNAc modification of radial glial vimentin filaments in the developing chick brain. *Brain Cell Biol.* **36**, 191–202. <https://doi.org/10.1007/s11068-008-9036-5> (2008).
33. Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S. & Hart, G. W. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4130–4140. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-11-1146> (2008).
34. Rotty, J. D., Hart, G. W. & Coulombe, P. A. Stressing the role of O-GlcNAc: Linking cell survival to keratin modification. *Nat. Cell Biol.* **12**, 847–849. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-847> (2010).
35. Ruan, H. B., Nie, Y. & Yang, X. Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with ubiquitination. *Mol. Cell Proteomics* **12**, 3489–3497. <https://doi.org/10.1074/mcp.R113.029751> (2013).
36. Kakade, P. S., Budnar, S., Kalraiya, R. D. & Vaidya, M. M. Functional implications of O-GlcNAcylation-dependent phosphorylation at a proximal site on keratin 18. *J. Biol. Chem.* **291**, 12003–12013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.728717> (2016).
37. Lambert, M., Claeysen, C., Bastide, B. & Cieniewski-Bernard, C. O-GlcNAcylation as a regulator of the functional and structural properties of the sarcomere in skeletal muscle: An update review. *Acta Physiol. (Oxf)* **228**, e13301. <https://doi.org/10.1111/apha.13301> (2020).
38. Cieniewski-Bernard, C. *et al.* Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **3**, 577–585. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400024-MCP200> (2004).
39. Cieniewski-Bernard, C., Dupont, E., Richard, E. & Bastide, B. Phospho-GlcNAc modulation of slow MLC2 during soleus atrophy through a multienzymatic and sarcomeric complex. *Pflugers Arch.* **466**, 2139–2151. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1453-y> (2014).
40. Cieniewski-Bernard, C. *et al.* O-GlcNAcylation, contractile protein modifications and calcium affinity in skeletal muscle. *Front. Physiol.* **5**, 421. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00421> (2014).
41. Hedou, J. *et al.* O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **282**, 10360–10369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606787200> (2007).
42. Nakamura, S., Nakano, S., Nishii, M., Kaneko, S. & Kusaka, H. Localization of O-GlcNAc-modified proteins in neuromuscular diseases. *Med. Mol. Morphol.* **45**, 86–90. <https://doi.org/10.1007/s00795-011-0542-7> (2012).
43. Hedou, J., Bastide, B., Page, A., Michalski, J. C. & Morelle, W. Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics* **9**, 2139–2148. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800617> (2009).
44. Deracinois, B. *et al.* O-GlcNAcylation site mapping by (azide-alkyne) click chemistry and mass spectrometry following intensive fractionation of skeletal muscle cells proteins. *J. Proteomics* **186**, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.005> (2018).
45. Cieniewski-Bernard, C., Mounier, Y., Michalski, J. C. & Bastide, B. O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* **100**, 1499–1505. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00865.2005> (2006).
46. Stevens, L. *et al.* Potential regulation of human muscle plasticity by MLC2 post-translational modifications during bed rest and countermeasures. *Arch. Biochem. Biophys.* **540**, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.016> (2013).
47. Lambert, M. *et al.* O-GlcNAcylation is a key modulator of skeletal muscle sarcomeric morphometry associated to modulation of protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1860**, 2017–2030. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.011> (2016).
48. Macauley, M. S. & Vocadlo, D. J. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydr. Res.* **344**, 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.04.017> (2009).
49. Gloster, T. M. *et al.* Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 174–181. <https://doi.org/10.1038/nchembio.520> (2011).
50. Schnuck, J. K. *et al.* Metabolic effects of physiological levels of caffeine in myotubes. *J. Physiol. Biochem.* **74**, 35–45. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0601-1> (2018).
51. Gao, L., Blair, L. A. & Marshall, J. CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: Reversible inhibition of L-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1606–1610. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.066> (2006).

52. Choi, S. *et al.* Procedures for the biochemical enrichment and proteomic analysis of the cytoskeleton. *Anal. Biochem.* **446**, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.025> (2014).
53. Grose, J. H. *et al.* Characterization of the cardiac overexpression of HSPB2 reveals mitochondrial and myogenic roles supported by a cardiac HspB2 interactome. *PLoS One* **10**, e0133994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133994> (2015).
54. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E. & Koike, T. Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **4**, 1513–1521. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.154> (2009).
55. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteomics* **5**, 749–757. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500024-MCP200> (2006).
56. Ishida, A. & Kameshita, I. In-gel protein phosphatase assays and other useful methods for the detection of protein phosphatase activities. *Anticancer Agents Med. Chem.* **11**, 47–53. <https://doi.org/10.2174/187152011794941280> (2011).
57. Kameshita, I., Baba, H., Umeda, Y. & Sueyoshi, N. In-gel protein phosphatase assay using fluorogenic substrates. *Anal. Biochem.* **400**, 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.035> (2010).
58. Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M. & Liao, J. “Heads and tails” of intermediate filament phosphorylation: Multiple sites and functional insights. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.008> (2006).
59. Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matsuyama, M. & Sato, C. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature* **328**, 649–652. <https://doi.org/10.1038/328649a0> (1987).
60. Caron, A. & Chapon, F. Desmin phosphorylation abnormalities in cytoplasmic body and desmin-related myopathies. *Muscle Nerve* **22**, 1122–1125. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199908\)22:8%3c1122::AID-MUS17%3e3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199908)22:8%3c1122::AID-MUS17%3e3.0.CO;2-T) (1999).
61. Rappaport, L. *et al.* Storage of phosphorylated desmin in a familial myopathy. *FEBS Lett.* **231**, 421–425 (1988).
62. Bouvet, M. *et al.* Desmin aggregopathy in rat and human ischemic heart failure through PKC ζ and GSK3 β as upstream signaling pathways. *Cell Death Discov.* **7**, 153. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00549-2> (2021).
63. Mercier, T. *et al.* Interplay between phosphorylation and O-GlcNAcylation of sarcomeric proteins in ischemic heart failure. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **9**, 598. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00598> (2018).
64. Cheng, T. J., Tseng, Y. F., Chang, W. M., Chang, M. D. & Lai, Y. K. Retaining of the assembly capability of vimentin phosphorylated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *J. Cell. Biochem.* **89**, 589–602. <https://doi.org/10.1002/jcb.10511> (2003).
65. Wang, Z., Pandey, A. & Hart, G. W. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminyl and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 1365–1379. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600453-MCP200> (2007).
66. Holt, G. D., Haltiwanger, R. S., Torres, C. R. & Hart, G. W. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J. Biol. Chem.* **262**, 14847–14850 (1987).
67. Hu, P., Shimoji, S. & Hart, G. W. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett.* **584**, 2526–2538. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.044> (2010).
68. Zeidan, Q. & Hart, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Implications for multiple signaling pathways. *J. Cell Sci.* **123**, 13–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.053678> (2010).
69. Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G. & Lagerlof, O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 825–858. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511> (2011).
70. Schwein, P. A. & Woo, C. M. The O-GlcNAc modification on kinases. *ACS Chem. Biol.* **15**, 602–617. <https://doi.org/10.1021/acscmbio.9b01015> (2020).
71. Dias, W. B., Cheung, W. D. & Hart, G. W. O-GlcNAcylation of kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.124> (2012).
72. Ma, J., Hou, C. & Wu, C. Demystifying the O-GlcNAc code: A systems view. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01006> (2022).
73. Erickson, J. R. Mechanisms of CaMKII activation in the heart. *Front. Pharmacol.* **5**, 59. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00059> (2014).
74. Jalan-Sakrikar, N., Bartlett, R. K., Baucum, A. J. 2nd. & Colbran, R. J. Substrate-selective and calcium-independent activation of CaMKII by alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* **287**, 15275–15283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.351817> (2012).

Acknowledgements

This research was funded by the Association Française contre les myopathies (CCB, project DESMINO-GlcNAc, contract number: 21011). CC was supported by a fellowship from the Association Française contre les myopathies (CC, project Glyco-Des, contract number: 22054). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We are also grateful to Pr D. Vocadlo for the pharmacological inhibitor of OGT.

Author contributions

C.C.: Investigation, Formal analysis Writing—Review and Editing. BB: Methodology, Writing—Editing. CCB: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing—Original Draft, Visualization, Supervision.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14033-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.C.-B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Article 2

O-GlcNAcylation as a regulator of the functional and structural properties of the sarcomere in skeletal muscle: An update review

Matthias Lambert | Charlotte Claeysen | Bruno Bastide | Caroline Cieniewski-Bernard 

Univ. Lille, EA 7369 - URePSSS - Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société, Lille, France

Correspondence

Caroline Cieniewski-Bernard, URePSSS Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société, EA7369 Laboratoire Activité Physique, Muscle et Santé, Euraspport - 413, avenue Eugène Avinée, Loos 59120, France.
Email: caroline.cieniewski-bernard@univ-lille.fr

Present Address

Matthias Lambert, Division of Genetics and Genomics, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Funding information

AFM-Téléthon, Grant/Award Number: PhD Fellowship #22054 and Research grant 21011 DESMINO-GlcNAc; Région Nord-Pas-de-Calais, Grant/Award Number: Emergent Research Project n°12003803

Abstract

Although the O-GlcNAcylation process was discovered in 1984, its potential role in the physiology and pathophysiology of skeletal muscle only emerged 20 years later. An increasing number of publications strongly support a key role of O-GlcNAcylation in the modulation of important cellular processes which are essential for skeletal muscle functions. Indeed, over a thousand of O-GlcNAcylated proteins have been identified within skeletal muscle since 2004, which belong to various classes of proteins, including sarcomeric proteins. In this review, we focused on these myofibrillar proteins, including contractile and structural proteins. Because of the modification of motor and regulatory proteins, the regulatory myosin light chain (MLC2) is related to several reports that support a key role of O-GlcNAcylation in the fine modulation of calcium activation parameters of skeletal muscle fibres, depending on muscle phenotype and muscle work. In addition, another key function of O-GlcNAcylation has recently emerged in the regulation of organization and reorganization of the sarcomere. Altogether, this data support a key role of O-GlcNAcylation in the homeostasis of sarcomeric cytoskeleton, known to be disturbed in many related muscle disorders.

KEYWORDS

calcium activation properties, contractile apparatus, exercise, neuromuscular disorders, O-GlcNAcylation, sarcomeric cytoskeleton

1 | INTRODUCTION

Skeletal muscle is recognized to be an intricate and highly complex machinery whose function is to generate force through muscle contraction.¹ Indeed, the efficient work of skeletal muscle is allowed by specialized myofibrils resulting from end-to-end arrangement of sarcomeres. The sarcomere is the functional unit of skeletal muscle (and in larger extent of striated muscles) and results from the strict organization of extremely sophisticated macromolecular protein complexes within a cytoskeletal network, termed nowadays “sarcomeric cytoskeleton”.¹⁻³ The precise and conserved localization of

constitutive proteins of these complexes is highly regulated, and leads to regular arrangement of the thin and thick filaments predominantly composed of actin and myosin; these two contractile proteins transiently interact during the cross-bridge cycles, leading to filament sliding and so generating force.⁴ Among actin and myosin which drive the mechanism of contraction, additional proteins regulate the process; in particular, tropomyosin coordinates the activation of thin filament, and the troponin complex modulates actomyosin cross-bridge formation. In addition to the thin and thick filaments, a third filament, composed of the giant protein titin, contributes to sarcomere elasticity and completes its

organization through the constitution of a genuine scaffold which permits the anchoring of several proteins and regulation of their sarcomeric localization. Titin filament is essential to muscle function ensuring not only the modulation of mechanical elasticity properties, but also the modulation of intracellular signalling pathways.⁵

While the contractile apparatus has to be maintained in this semi-crystalline organization to ensure its work, the sarcomeric cytoskeleton is neither passive nor static, but outstandingly dynamic. As consequence, all the components of this cytoskeletal framework need to be strictly maintained in

an equilibrium in terms of protein-turnover, assembly and maintenance.^{1,6-8} It is worth to note that phosphorylation regulates some aspects of this structural homeostasis, in particular through the modulation of protein-protein interactions at two nodal points of the sarcomere: M-band and Z-disk. Phosphorylation is involved in the formation and maintenance of the structural interactome, as it was demonstrated for telethonin,⁹ myomesin^{10,11} or desmin.¹² Interestingly, changes of protein phosphorylation were associated to skeletal muscle disorders, such as for desmin filaments¹² or MyBPc in mouse dystrophic muscles.¹³ Phosphorylation

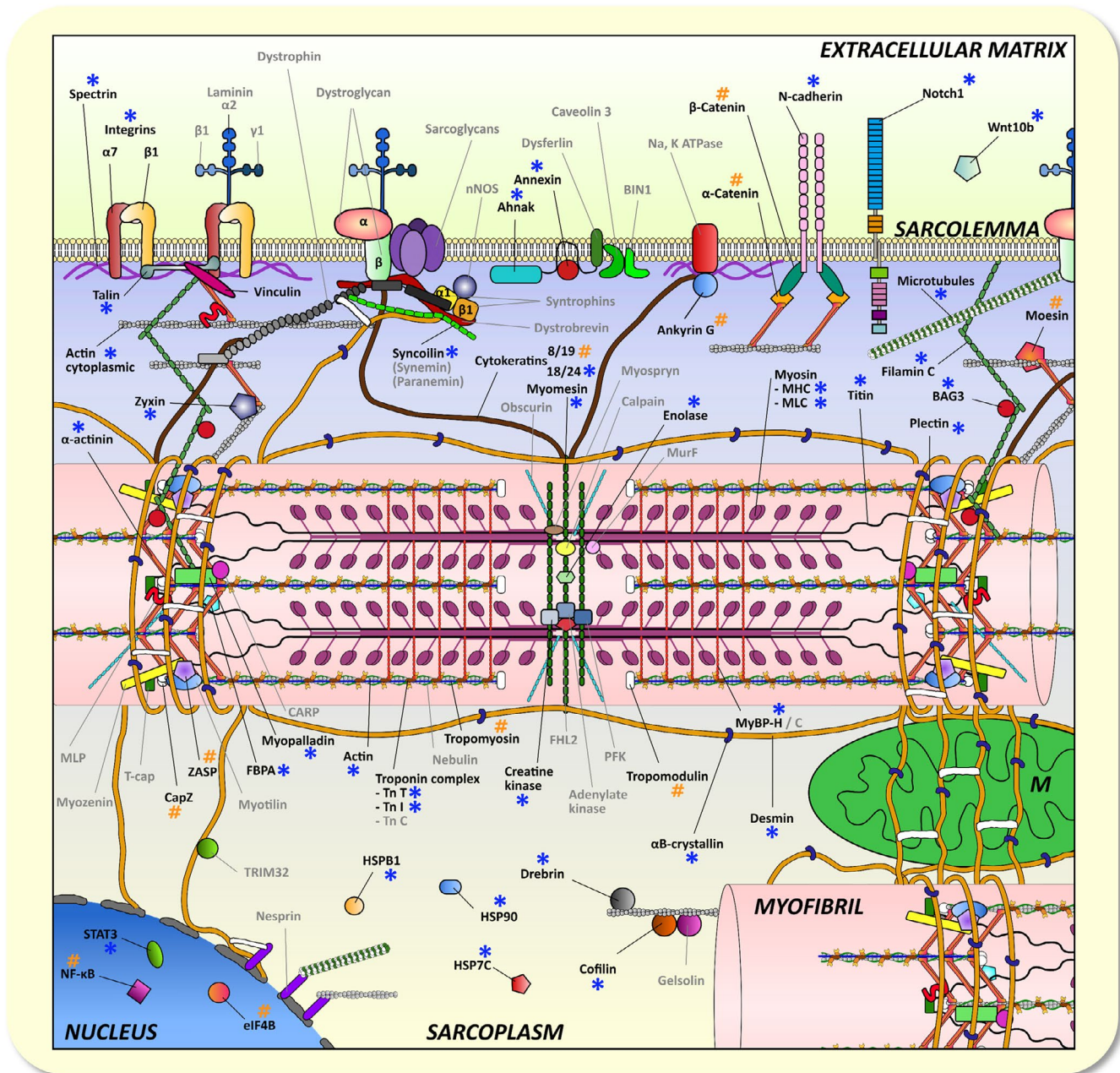


FIGURE 1 Schematic cartoon of O-GlcNAc-modified proteins involved in the physiology of the skeletal muscle. A non-exhaustive list of O-GlcNAc proteins identified in skeletal muscle cells is displayed with a blue (*) symbol, whereas a non-exhaustive list of potential O-GlcNAc proteins is displayed with an orange (#) symbol, since they have been identified in other cell types

is also involved in the modulation of skeletal muscle contraction in particular through the modification of regulatory myosin light chain which provides a molecular memory of contraction.^{14,15}

In addition, another post-translational modification emerged in the last 15 years which is crucial in the physiology and physiopathology of skeletal muscle. This post-translational modification, termed O-GlcNAcylation (O-N-acetyl- β -D-glucosaminylation), corresponds to an atypical glycosylation since a unique monosaccharide, the N-acetyl-D-glucosamine, is linked on hydroxyl group of serine and threonine amino acids of a protein through a β -linkage¹⁶ (for recent reviews¹⁷⁻¹⁹). In addition, O-GlcNAcylation is highly dynamic and reversible (such as phosphorylation) because of a unique pair of antagonist enzymes: the OGT or O-GlcNAc transferase, which transfers the monosaccharide onto a protein,^{20,21} and the OGA or O-GlcNAcase, which removes it.^{22,23} In the overall skeletal muscle cell, over a thousand of O-GlcNAc-modified proteins have been identified since 2004.²⁴⁻²⁹ The nature of these proteins is diverse, including contractile, sarcolemmal, structural and cytoskeletal proteins, which are involved in sarcomeric cytoarchitecture; an updated and summarized schematic cartoon of the O-GlcNAcylated skeletal muscle proteome is presented in Figure 1. The nature of O-GlcNAcylated proteins is even

more diverse, including mitochondrial proteins, enzymes, transcription factors and signalling proteins as well. Thus, akin to phosphorylation,³⁰⁻³³ O-GlcNAcylation could play a significant role in sarcomere regulation as well as in various physiological functions of skeletal muscle. This review discusses the updated involvements of O-GlcNAcylation in the modulation of contractile and structural properties of skeletal muscle, as well as its potential repercussion in a physiopathological context.

2 | O-GLCNACYLATION: A MODULATOR OF CALCIUM ACTIVATION PROPERTIES OF THE SARCOMERE IN SKELETAL MUSCLE

2.1 | A first story with evidences

Many O-GlcNAc-modified contractile proteins as well as regulatory proteins of the contraction have been identified within the sarcomere of skeletal muscle including actin, myosin, myosin light chains (the essential MLC or MLC1, and the regulatory MLC or MLC2), and tropomyosins, troponins T and I respectively (Figure 1). In the view of a large number of contractile and regulatory proteins bearing

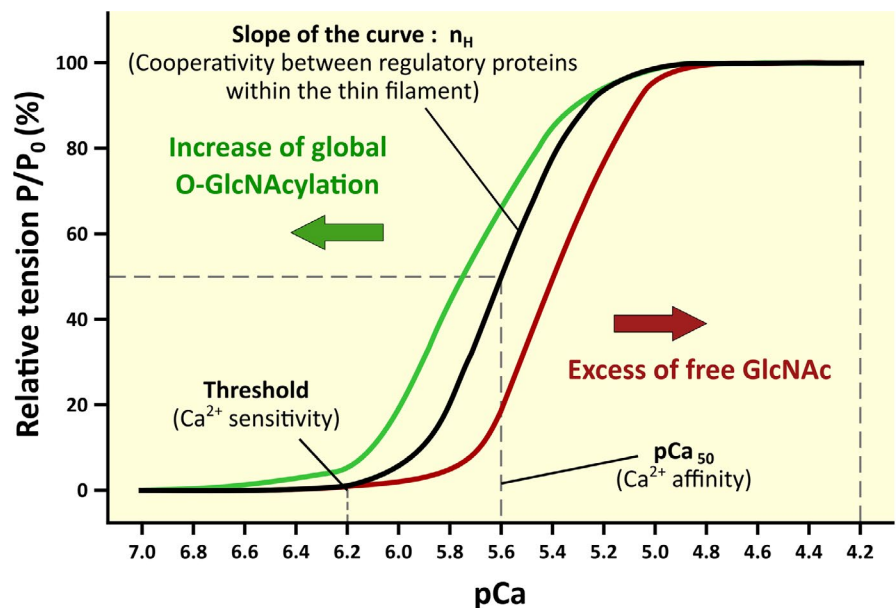


FIGURE 2 Impact of O-GlcNAcylation process on calcium activation properties of slow skeletal muscle fibres isolated from soleus. Top, representative curve of the relation tension/pCa with $pCa = -\log [Ca^{2+}]$. Tension corresponds to the ratio P/P_0 with P the tension developed by the fibres at a given pCa, and P_0 the maximal tension developed by the fibre at a $pCa_{4.2}$. The T/pCa curve following modification of O-GlcNAcylation process were indicated. Bottom, table indicates the variation of calcium activation parameters (threshold, Hill coefficient, pCa_{50} and P_0) following the modification of the O-GlcNAcylation process

Method		Excess of free GlcNAc		Increase of O-GlcNAcylation (using PUGNAc or Thiamet-G)
		Rat soleus	Human soleus	Rat soleus
Parameters measured	Threshold	-	-	=
	n_H	=	=	=
	pCa_{50}	-	-	+
	P_0	=	=	=

O-GlcNAc moiety, our lab focused on the involvement of O-GlcNAcylation in skeletal muscle contractility and successfully highlighted O-GlcNAcylation as a modulator of calcium activation properties of the sarcomere using skinned skeletal muscle fibres. Measurement of relative tension developed by the fibre depending on various calcium concentrations (tension/pCa relationship) led to determine four parameters: (i) the calcium sensitivity of sarcomere from pCa threshold for fibre tension activation; (ii) the affinity of sarcomere for calcium from pCa₅₀ for 50% of maximal developed tension; and (iii) the cooperativity between the different regulatory proteins (troponins and tropomyosins) within the thin filaments from the slope of the curve (Hill coefficient n_H) (Figure 2).³⁴ The maximal tension P_0 developed by the fibre, induced by a saturating calcium concentration (pCa 4.2), had been consequently determined as well (Figure 2).³⁴

In a first approach, fibres from slow-twitch rat soleus were incubated with N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) in excess to impair potential O-GlcNAc-dependent protein-protein interactions.²⁶ Compared to control conditions, T/pCa relationship shifted towards lower pCa values (Figure 2). The pCa threshold and pCa₅₀ value were significantly reduced, meaning that calcium sensitivity and affinity of sarcomere were decreased respectively. Hill coefficient (n_H) and P_0 value were not significantly altered (Figure 2). Interestingly, when GlcNAc was then removed from the solution, the modulated effects were fully reversible and returned to control values.²⁶ These results were also reproduced on human skeletal muscle fibres, and confirmed the reversible decrease in sarcomere sensitivity and affinity to calcium.³⁵ Additional experiments were done on rat soleus fibres after an increase in global O-GlcNAc level using PUGNAc and Thiamet-G, both potent inhibitors of O-GlcNAcase (OGA).²⁵ Unlike the excess GlcNAc conditions, T/pCa relationship was shifted to higher pCa values (Figure 2). Indeed, pCa₅₀ value was significantly increased (but not pCa threshold value) meaning that calcium affinity of sarcomere was increased, whereas Hill coefficient (n_H) and P_0 value were not significantly altered (Figure 2).²⁵ This first story with evidences revealed that calcium activation properties of sarcomere were modulated according to O-GlcNAcylation. However, the exact mechanism(s) involved in the modulation of calcium activation parameters through O-GlcNAcylation is (are) still not well understood and need to be clarified.

In this last study, the regulatory myosin light chain sMLC2 was the only slow fibre isoform presenting a significant modulation and increase in O-GlcNAcylation in slow-twitch skinned rat soleus treated with PUGNAc (the rest of proteins showing a modulation of O-GlcNAcylation belonged to fast isoforms and were then excluded from the study). Thus, sMLC2 was proposed to be one of the candidate proteins which could be involved in the regulation of calcium

activation parameters of skeletal muscle fibres through its O-GlcNAcylation (for review³⁶).²⁵

2.2 | The regulatory myosin light chain (MLC2): A candidate protein involved in this mechanism

Calcium release from sarcoplasmic reticulum is essential for skeletal muscle to modulate actomyosin interactions and contraction. Calcium binds troponin C that changes the conformational state of tropomyosin and troponin complex to provide free binding sites on actin filaments to myosin motor domain and assists actomyosin interactions (for reviews^{4,30}).³⁷⁻⁴⁰ If calcium is essential to trigger the sliding theory of actomyosin filaments, it can also modulate the contraction in another way. Indeed, through the increase in cytoplasmic calcium concentration, four calcium ions bind calmodulin and initiate its interaction with Myosin Light Chain Kinase (MLCK).⁴¹ This Ca²⁺/calmodulin-dependent serine-threonine protein kinase is thus activated, and exposes its catalytic domain to phosphorylate the disordered N-terminal region of sMLC2 at Ser14 (or Ser15 for fMLC2) (for review¹⁴). The MLC2 non-covalently surrounds the neck domain of myosin and provides it a mechanical support.^{42,43} Although non-essential for contraction, phosphorylation of regulatory light chains enhances sarcomere contractility, especially by increasing the calcium sensitivity.^{44,45} This raise of calcium sensitivity is proportional to ATPase activity of actomyosin and suggests that MLC2 phosphorylation enhances the number of actomyosin cross-bridges.⁴⁶ More precisely, some studies revealed that addition of negative charge from phosphate leads to position shift of myosin heads through electrostatic repulsive forces between MLC2 and myosin heavy chains. The myosin motor domain is moved towards actin thin filaments axially and proximally which facilitates cross-bridges formation.⁴⁷⁻⁴⁹ From a kinetic point of view, MLC2 phosphorylation is slower than contraction and would be a biochemical memory to enhance muscle mechanical functions during prolonged or repetitive activity, and modulate muscle fatigue.¹⁴ This molecular mechanism is also reversible through myosin phosphatase target subunit 2 (MYPT2)⁵⁰ and protein phosphatase 1 (PP1)^{50,51} that recognizes and dephosphorylates MLC2 respectively.

Interestingly, MLC2 has been identified as O-GlcNAcylated in skeletal muscle.²⁶ While the O-GlcNAcylation site is not precisely localized to date in skeletal muscle, it is mapped in cardiac muscle tissue at Ser15.⁵² Interestingly, this potential O-GlcNAcylated site on slow skeletal isoform is located to the only site of phosphorylation at Ser14 on sMLC2.^{41,52} Thus, O-GlcNAcylation would play a significant role in calcium activation properties of sarcomere including a close interplay with phosphorylation in skeletal muscle. In this way,

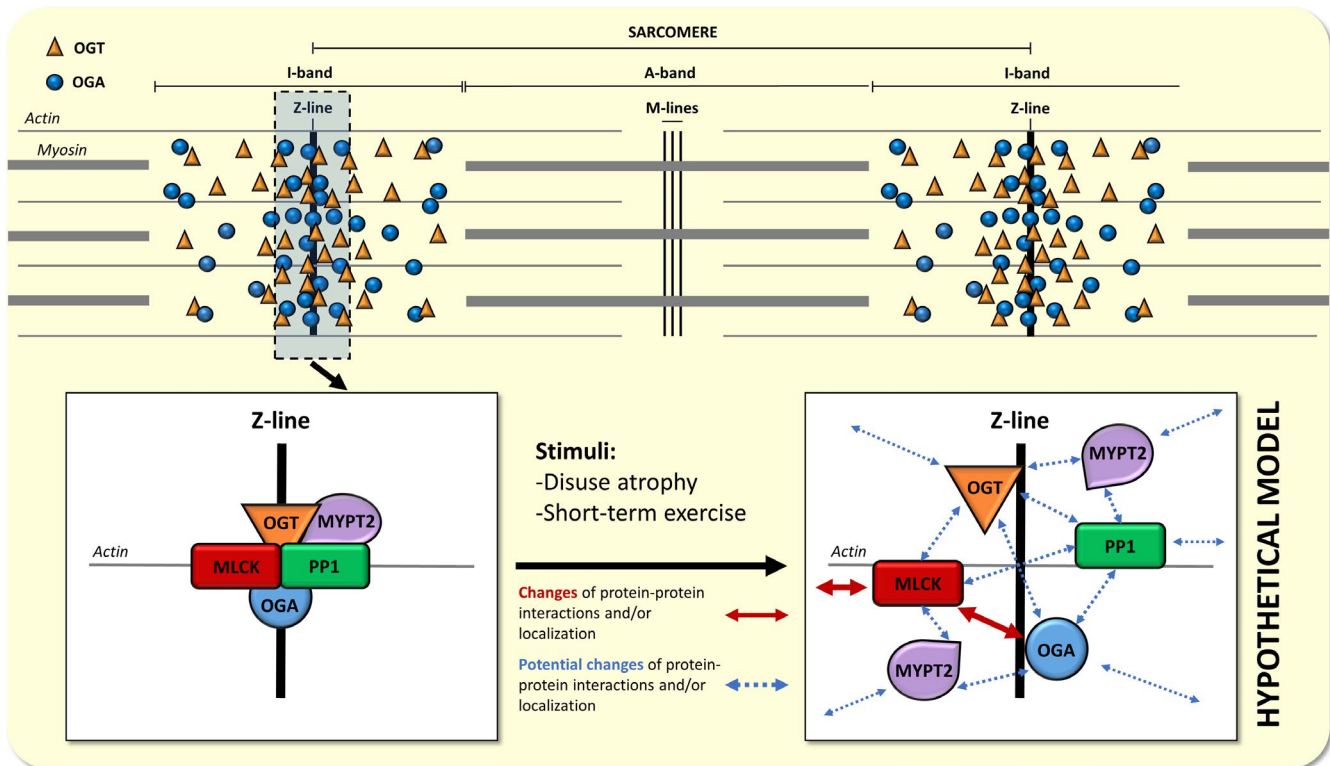


FIGURE 3 Representative scheme of the preferential localization of OGT and OGA within the sarcomere. Both OGT (orange triangle) and OGA (blue circle) are preferentially localized to the Z-line, and in less extent, on I-band. According to physiological (exercise) or pathological (functional atrophy) signals, the localization of OGT and OGA, so as their interaction with MLCK, PP1 and MYPT2 within a multienzymatic complex, could change

an original study on rat soleus showed that phosphorylation and O-GlcNAcylation were mutually exclusive on sMLC2.⁵³ This fine interplay was reinforced by the interaction of enzymes involved in O-GlcNAcylation and phosphorylation of MLC2, ie, the pairs MLCK/MYPT2/PP1 and OGT/OGA, within a multienzymatic complex around the Z-line of the sarcomere (Figure 3); it was the first report showing that OGT and OGA presented a preferential localization at the Z-line in striated muscle and in less extent to the I-band.⁵³ To support the key role of this multienzymatic complex in the modulation of O-GlcNAcylation/phosphorylation interplay in the fine regulation of sMLC2 activity, it was demonstrated that the co-localization of MLCK and OGA changed in disuse conditions, in correlation with changes in the level of O-GlcNAcylation and phosphorylation on sMLC2 (this specific point will be discussed later in this review).⁵³ However, the exact role and molecular mechanism of O-GlcNAcylation on MLC2 is still unknown. Its involvement in the modulation of electrostatic forces between MLC2 and MHC seems unlikely, since O-GlcNAc is a non-charged moiety. One hypothesis would be that O-GlcNAc moiety causes a steric hindrance between MLC2 and MHC since O-GlcNAc gets its large size because of its Stokes radius which is four to five times larger than a phosphate.⁵⁴ Taken together, this data strongly

suggests that MLC2 is one of the protein candidates to explain the role of O-GlcNAcylation as a modulator of contractile activity in skeletal muscle.

2.3 | The dynamic of O-GlcNAcylation/phosphorylation interplay on MLC2 varies according to activity pattern of skeletal muscle

2.3.1 | Impact of exercise on O-GlcNAcylation/phosphorylation of MLC2

Two recent studies revealed the impact of exercise on the interplay between phosphorylation and O-GlcNAcylation on rat MLC2, considering a treadmill running through a single acute exercise (exercise exhaustion) or a long-term exercise (6-weeks training).^{55,56}

After a single acute exercise, whereas the global O-GlcNAcylation level remained unchanged in both slow-twitch soleus and fast-twitch EDL,⁵⁶ a fine modulation of O-GlcNAcylation was observed on some specific myofibrillar proteins.⁵⁵ Indeed, in the soleus, the O-GlcNAc level of sMLC2 tended to slightly increase ($P = 0.07$), while its phosphorylation significantly decreased.⁵⁵ The modulation of sMLC2 phosphorylation and O-GlcNAcylation was reversed and similar to control after 24 hours recovery.⁵⁵ After

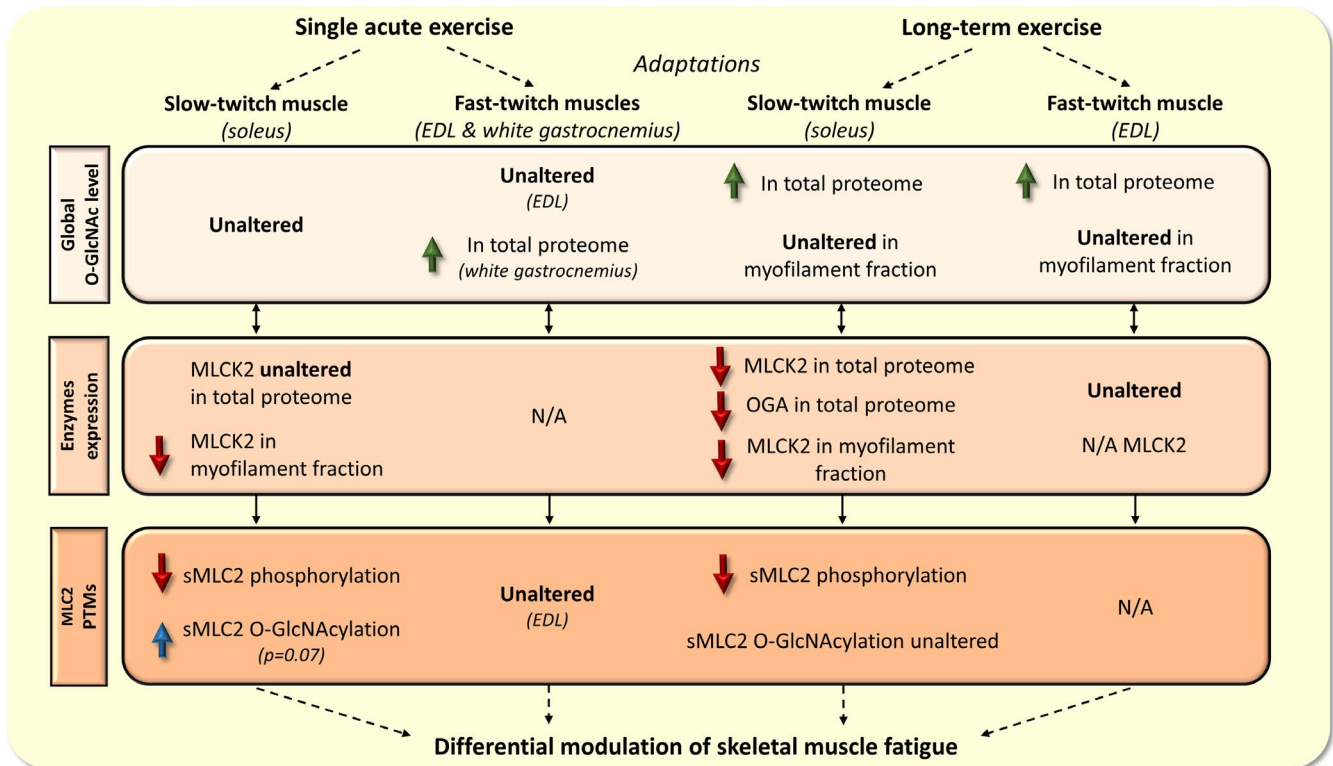


FIGURE 4 Differential regulation and modulation of O-GlcNAc/Phospho-MLC2 in rat slow-twitch and fast-twitch muscles following exercises. N/A means Non-Available data in the literature

this acute exercise, expression of MLCK was not altered in the total extract, whereas its expression in the myofilament fraction was decreased (Figure 4). The modulation of sMLC2 and MLCK seemed to be swift since a 100 sec in situ exercise protocol (fatiguing shortening contractions) in the soleus showed both a decrease in sMLC2 phosphorylation and MLCK expression in myofilament fraction.⁵⁵ It reveals a quick responding system, and might suggest changes of MLCK localization by dissociating the enzyme from the myofilament to reduce the amount of available MLCK near sMLC2. As already described above, MLCK can be localized at the sarcomere within a multienzymatic complex including OGA and OGT (Figure 3).⁵³ However, after acute exercise, expression of O-GlcNAc processing enzymes OGT/OGA was not altered in the total nor in myofilament fraction, and rather suggested that enzyme activity could change to finely modulate the O-GlcNAcylation level in the soleus.⁵⁵ Regarding EDL, no changes of fMLC2 phosphorylation/O-GlcNAcylation balance or regulating enzyme expressions were observed.⁵⁵ This data reinforces the paradigm of a differential modulation of fatigue through MLC2, and *in fine* the calcium sensitivity of sarcomere, between slow and fast-twitch skeletal muscles (Figure 4) (for review⁵⁷).^{58,59} The role of O-GlcNAcylation in this mechanism is still unclear and might be complex, since unlike the soleus and EDL, the global O-GlcNAcylation level of fast-twitch white gastrocnemius was significantly increased following a single acute exercise

in rat; however, post-translational modifications of MLC2 were not investigated (Figure 4).⁶⁰ Such complexity was also displayed at resting conditions since O-GlcNAcylation and phosphorylation level of MLC2 were higher in EDL compared with soleus, on slow as well as on fast isoforms; there was also a discrepancy between the two type of muscles in the expression of proteins involved in both post-translational modifications.⁵⁶

Unlike a single acute exercise, a long-term training program on rat led to an increase in global O-GlcNAcylation level in the total extract of soleus and EDL, but remained unaltered in the myofilament fraction (Figure 4).⁵⁶ In the soleus, phosphorylation of sMLC2 decreased while its O-GlcNAcylation was not modified; the fMLC2 post-translational modifications in EDL were not provided. Finally, in the soleus, expression of MLCK was decreased in the myofilament fraction and in the total extract as well (Figure 4).⁵⁵ Contrary to the acute exercise and a potential relocation of MLCK, the involvement of transcriptional mechanisms was also suggested for the regulation of MLCK expression in a long-term exercise. Interestingly, OGA expression was decreased in the total extract but not in the myofilament fraction, which could explain the increase in global O-GlcNAc level in soleus. In contrast, expression of the regulating enzymes was not altered in the EDL (Figure 4).⁵⁵

Thus, these O-GlcNAc adaptations following skeletal muscle activity seemed to be fully different according to

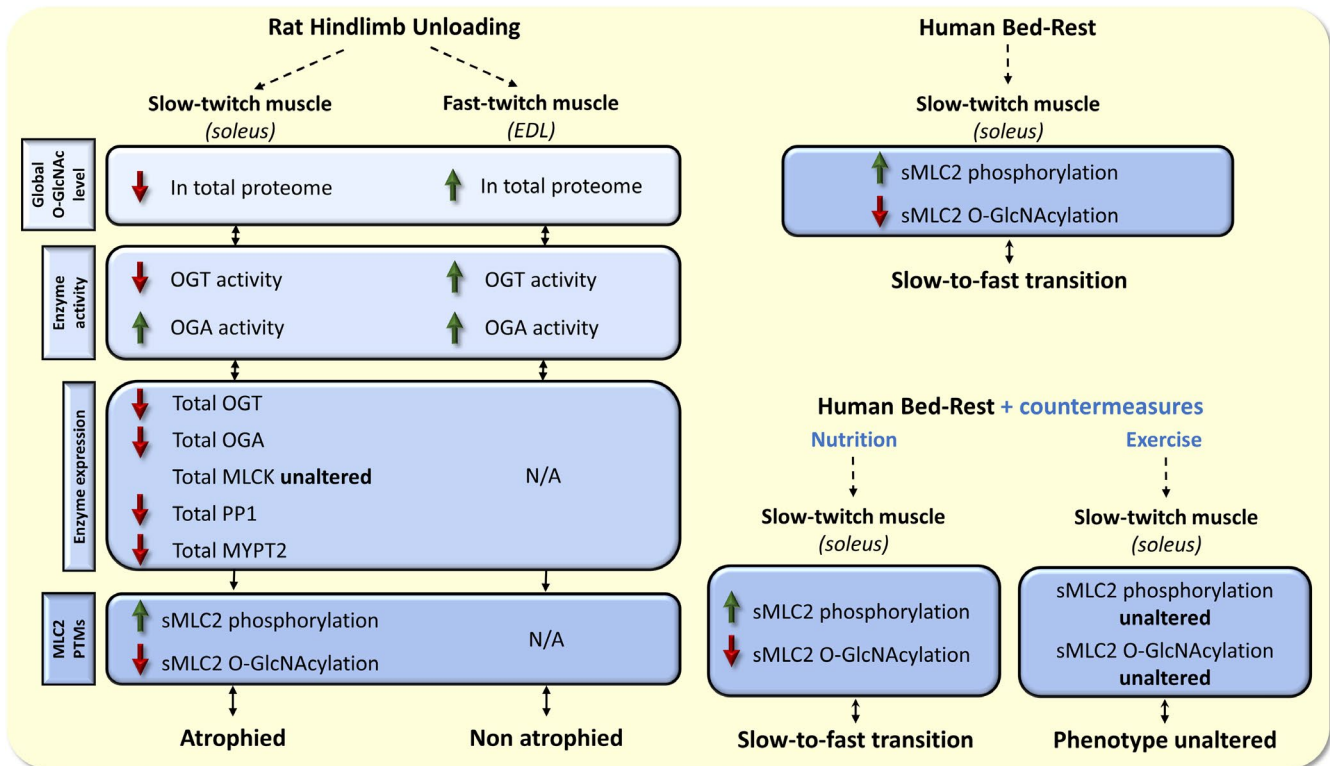


FIGURE 5 Differential regulation and modulation of O-GlcNAc/Phospho-MLC2 in slow-twitch and fast-twitch muscles following disuse conditions in rat and human. N/A means Non-Available data in the literature

exercise protocol as well as skeletal muscle fibre type. Using the “MLC2 case,” first concepts can be assumed since a single acute exercise might involve local short-term O-GlcNAc-related adaptations on localization and protein activity. In another way, a long-term exercise might involve additional global long-term O-GlcNAc-related adaptations on gene expressions (Figure 4). The differences observed between muscle types might also be partly explained by a differential metabolism linked to O-GlcNAcylation. Indeed, the modulation of the O-GlcNAc pattern and the O-GlcNAc processing enzymes is also completely different between both of these muscle fibre type at resting conditions.^{55,61} It is well known that the metabolism and stress response between fast-twitch glycolytic muscles and slow-twitch oxidative muscles are different; this could suggest a differential modulation of the O-GlcNAcylation process with differential consequences on cellular functions during basal and exercise conditions (for recent review⁶²).

2.3.2 | Impact of disuse on O-GlcNAcylation/phosphorylation of MLC2

In a model of disuse atrophy (rat model of hindlimb unloading (HU)), it was shown that global O-GlcNAcylation level decreased in the soleus (whereas it increased in EDL),⁶¹ while specific variations were investigated on proteins of interest, in particular MLC2. Following 14-days HU, sMLC2

O-GlcNAcylation decreased while its phosphorylation increased (Figure 5).⁵³ This modulation of these post-translational modifications was totally reversed and returned to control values after 14-days reloading.⁵³ Interestingly, both post-translational modifications were mutually exclusive on sMLC2, and the multienzymatic complex involved in O-GlcNAc and phospho-MLC2 modification, seemed to be partially reorganized at the Z-line where the colocalization between the MLCK and OGA was increased (Figure 3).⁵³ Interestingly, in the cardiac tissue of diabetic STZ-rats and diabetic human patients where global O-GlcNAcylation level is increased and sarcomere calcium sensitivity is decreased, OGT and OGA localization pattern appeared to be redistributed along the sarcomere. This observation was associated with an increase in OGA interactions with α -actin, α -tropomyosin and MLC1, whereas its interaction with OGT was unaltered.⁶³ In the context of skeletal muscle disuse, we can likely assume that potential fine relocalizations and changes of interactions might happen between enzymes regulating O-GlcNAc- and phospho-MLC2 modifications (Figure 3). A second level of regulation showed that OGT and OGA activities were, respectively, increased and decreased in atrophied soleus following HU period (Figure 5).⁶¹ A potential redistribution of enzymes within the sarcomere associated to a change of activity might result to a change of O-GlcNAcylation/phosphorylation stoichiometry in some compartments within the sarcomere,

and explain the fine regulation of PTMs of some key myofibrillar proteins, including MLC2. Such further investigations could reinforce the close interplay concept between phosphorylation and O-GlcNAcylation to modulate MLC2 functions, as well as contractile properties in atrophied soleus regardless of muscle mass loss.

In human, sMLC2 was also altered following 60-days Bed-Rest.⁶⁴ Indeed, MLC2 O-GlcNAcylation decreased while its phosphorylation increased (Figure 5),⁶⁴ which was associated to impairment of sarcomeric calcium properties.⁶⁵ These changes were accompanied by slow-to-fast transitions in Myosin Heavy and Light chains, as well as troponin C and T.⁶⁴ The modulation of muscle phenotype and MLC2 modifications was fully reversed following a resistance training programme and aerobic exercises during Bed-Rest while branched chain amino acids supplementation was not successful to counteract the atrophy phenotype nor the MLC2 modifications (Figure 5).⁶⁴ Unfortunately, the modification of O-GlcNAcylation and phosphorylation pattern on MLC2 were not investigated in human EDL following Bed-Rest. It would have been interesting to compare the molecular response of the EDL, since the modulation after exercise seems to be dependent of muscle phenotype.

It is worth noting that several data suggested that phosphorylation of MLC2 was closely associated to an increase in calcium sensitivity of muscle fibres.^{14,44,45} However, disuse and ageing are closely associated to a decrease in calcium sensitivity⁶⁶ whereas MLC2 phosphorylation increases^{67,68}; thus, the decrease in calcium sensitivity during HU might not only result from variation of phosphorylation. While it was demonstrated that O-GlcNAcylation could be involved in the modulation of calcium activation parameters in skeletal muscle,^{25,26,35} potentially *via* the regulatory Myosin Light Chain MLC2, it is reasonable to hypothesize that MLC2's O-GlcNAcylation changes could be associated to changes in calcium sensitivity observed during functional atrophy. As support to this hypothesis, decrease in sMLC2 O-GlcNAcylation was observed in rat HU and human Bed-Rest, which may explain the decrease in calcium sensitivity throughout functional atrophy of soleus. From this view, changes of O-GlcNAcylation of sMLC2 seem to be associated with contractile dysfunction whereas phosphorylation changes associated to muscle plasticity could be rather associated with phenotypic changes. More studies need to be done to precisely define the role the O-GlcNAcylation/phosphorylation balance of MLC2 and how it works on skeletal muscle contractility as well as on muscle phenotype changes. Indeed, decrease in MLC2 O-GlcNAcylation has been shown to be associated with slow-to-fast transitions in human soleus after Bed-Rest as previously described. It has also been shown that a global increase in O-GlcNAcylation in skeletal muscle occurs during ageing,⁶⁹ associated to sarcopenia and slow-to-fast changes; however, O-GlcNAcylation of MLC2 has not

been studied. From this second view, it would be worth to investigate this context, regardless of phosphorylation.

2.4 | Other candidate proteins to explain the modulation of the calcium properties of skeletal muscle through O-GlcNAcylation?

Although MLC2 could explain the modulation of calcium activation properties by O-GlcNAcylation not only in skeletal muscle but also in cardiac muscle,⁵² the involvement of other contractile or regulatory proteins cannot be excluded.

For instance, troponins I and T have been identified as being O-GlcNAcyated in skeletal and cardiac muscle.^{25,52} Phosphorylation on Ser23 and 24 of troponin I through PKA (Protein Kinase A) is known to decrease the calcium sensitivity in cardiac cells⁷⁰; however, cardiac-skinned fibres exposed to free GlcNAc in excess also showed a decrease in calcium sensitivity without affecting phosphorylation on Ser23/24 of troponin I.⁵² Moreover, in myectomy samples from patients affected by hypertrophic obstructive cardiomyopathy because of troponin T abnormality, level of TnI Ser23/24 phosphorylation was decreased and not associated to any alteration of calcium sensitivity.⁷¹ In another way, troponin I is also described to be O-GlcNAcyated or phosphorylated on Ser150 through PAK3 (Serine/Threonine-protein kinase PAK3); the phosphorylation at that site increased the calcium sensitivity,^{72,73} but the role of O-GlcNAc moiety on this amino acid residue has not been yet investigated.

In another study, a dynamism between O-GlcNAcylation and phosphorylation was recently described on cardiac troponin T from ischemic heart cells where contractile properties are altered.⁷⁴ However, in our model of slow fibres exposed to OGA inhibitors,²⁵ even if fast isoforms TnT and TnI showed an increase in their O-GlcNAcylation level, they are not expressed in slow-twitch soleus; so, TnT O-GlcNAcylation could not explain the modulation of the calcium activation properties of the sarcomere in this context.²⁵ It is worth noting that many sarcomeric proteins, including troponins, contain intrinsically disordered regions,^{75,76} that might serve as crucial regulators for different cellular mechanisms.⁷⁷ O-GlcNAcylation preferentially occurs in secondary structures such as loop and disorganized regions instead of α -helix or β -strand peptides.⁷⁸ Thus, more O-GlcNAc sites might be expected in this class of proteins, such as troponins or others, known to be involved in calcium properties of sarcomere. In STZ-rat heart, MHC, α -sarcomeric actin and α -tropomyosin also displayed an increase of O-GlcNAcylation on some identified sites.⁶³ Although the phenotype was associated with a decrease in sarcomere calcium sensitivity, these specific O-GlcNAc changes have not yet been investigated related to calcium sensitivity. To elucidate the role of O-GlcNAcylation at local level, precise O-GlcNAc mapping site identification on these proteins of interest is required.

Thus, sMLC2 is to date the only actor described in the skeletal muscle that could modulate the calcium activation properties of sarcomere through O-GlcNAcylation. However, its exact molecular mechanism, as well as its close interplay with phosphorylation, especially through the action and the regulation of multienzymatic complex within the sarcomere Z-line, needs to be investigated in further studies. Moreover, most of the contractile and regulatory proteins previously cited are involved in the length-dependent activation of sarcomere. Since the global O-GlcNAcylation level impacts the morphometry of sarcomere (ie, sarcomere length discussed later in this review) in skeletal muscle cells,²⁸ the potential effect of O-GlcNAcylation in this mechanism associated to calcium properties of sarcomere should be investigated to bring new insights in the regulation of striated muscle contractility.

3 | EMERGENCE OF A NEW ROLE OF O-GLCNACYLATION IN THE SARCOMERE STRUCTURE OF SKELETAL MUSCLE

It is well known that skeletal muscle, characterized by its striated appearance, has an incredible architecture, essential for muscle functions including contraction. This structure is due to the accurate and fine organization of actin and myosin myofilaments within the sarcomere (for reviews^{2,3,79,80}). Although highly dynamic,⁸ this sarcomeric organization is maintained through multiple protein-protein interactions within an intricate sarcomeric cytoskeleton network, including structural proteins (for reviews^{2,3,81}). In particular, the Z-line^{82,83} and M-band⁸⁴ are described as nodal points and hotspots for several dynamic interactions between different types of proteins (Figure 1). Some studies revealed that post-translational modifications such as phosphorylation can modulate protein-protein interactions known to be crucial for the sarcomere structure. Indeed, telethonin phosphorylation on its C-terminal domain seems to be required for sarcomere assembly.⁹ Moreover, other studies reported that phosphorylation plays a significant role in titin-myomesin¹⁰ and ZASP-myotilin interactions.⁸⁵ Recent mass spectrometry analysis revealed that the Z-line of striated muscle is a hotspot for protein phosphorylation³³ and O-GlcNAcylation as well.²⁹ Indeed, O-GlcNAcylation also modifies many key structural proteins of the sarcomere, such as α -actinin, α B-crystallin, BAG3 (BCL2 Associated Athanogene 3), desmin, filamin-C, myomesin, myopalladin, plectin, titin, ZASP (Z-band Alternatively Spliced PDZ-motif), and so on (Figure 1).

In a recent study, we focused on the role of O-GlcNAcylation in sarcomere structure. Using Thiamet-G to inhibit O-GlcNAcase and increase the global O-GlcNAcylation level in C2C12 myotubes, the main data of this study was a linear modulation of the sarcomeric morphometry according

to myofilament O-GlcNAc rate.²⁸ Indeed, the dark band and M-band widths increased, while the I-band width and the sarcomere length decreased according to myofilament O-GlcNAc level. Morphometry parameters measurement is one of the strongest parameters of the sarcomere structure; thus, changes of sarcomeric morphometry after O-GlcNAcylation modulations led to the conclusion that O-GlcNAcylation was a key modulator of the sarcomeric structure. Interestingly, protein-protein interactions within some protein complexes were modulated in parallel of the morphometry changes, including some key structural proteins of the sarcomere, α -actinin, α B-crystallin, desmin and filamin-C.²⁸ However, the direct link between the sarcomeric morphometry and the modulation of protein-protein interactions through O-GlcNAcylation was not clearly established and needs to be clarified.

Interestingly, it was demonstrated that the interaction between desmin and its molecular chaperone α B-crystallin, was significantly changed according to global O-GlcNAcylation level.²⁸ Desmin is the major intermediate filament protein in skeletal muscle, crucial for structural integrity of sarcomere and the cell⁸⁶; thus, a desmin knock-out in mice leads to sarcomeric structure impairments with a misalignment of Z-lines.⁸⁷ Moreover, desmin is a hotspot for many post-translational modifications,⁸⁸ in particular O-GlcNAcylation, phosphorylation and ubiquitination. Interestingly, in addition to being O-GlcNAcyated, desmin has lectin-like properties⁸⁹ and a broad interactome in skeletal muscle cells.⁹⁰ While phosphorylation is known to modulate desmin polymerization,^{91,92} O-GlcNAcylation could be also involved in the polymerization state of desmin since O-GlcNAcylation modulates cytokeratins filaments 8/18⁹³ and tubulin polymerization.⁹⁴ Recently, an O-GlcNAc site has been located on the Ser459 of desmin in murine skeletal muscle cells.²⁹ SW13 cells transfected with S459I mutant desmin show shorter desmin filaments and desmin aggregations in the cytoplasm.⁹⁵ Indeed, this amino-acid residue is located in the carboxy-terminal "tail" domain of desmin, which controls lateral packing, thus the diameter of intermediate filaments,^{96,97} as well as longitudinal head-to-tail tetramer assembly.^{96,98} This domain also seemed to be involved in lateral interaction with other cytoskeletal proteins.^{98,99} The second actor, α B-crystallin, is known to be the molecular chaperone of desmin, playing a role in the localization and aggregation of desmin filaments¹⁰⁰ as well as in its assembly.¹⁰¹ Activity of α B-crystallin was first known to be regulated by phosphorylation,^{102,103} while its O-GlcNAcylation on Thr170 seemed regulate its localization.¹⁰⁴ Recently, the Thr162 residue on α B-crystallin was identified to be O-GlcNAcyated as well²⁹; this residue is located on its C-terminal domain known to directly interact with desmin.¹⁰⁵ The deletion of amino acid residues from position 155 to 165 on α B-crystallin leads to the increase in its cosedimentation with desmin and an improvement of filament-filament interactions.¹⁰⁵ Interestingly,

repercussion of α B-crystallin mutation, ie, R120G, has been described in a pathological context showing desmin aggregation features.^{106,107} However, the exact role of Thr162 residue on α B-crystallin, as well as its O-GlcNAcylation have not been yet investigated. Altogether, this data suggests that the involvement of α B-crystallin and desmin cannot be excluded to explain the modulation of the sarcomere structure by protein-protein interactions changes through O-GlcNAcylation.

Other skeletal muscle proteins should not be excluded as well, and many investigations about the role of O-GlcNAcylation in the modulation of protein-protein interactions must be pursued since several O-GlcNAc sites have been identified in interaction domains of several proteins of interest. Indeed, O-GlcNAc sites were found on MHC very close to its polymerization domain and its interaction domains with myomesin and titin.²⁷ It is worth noting that the O-GlcNAc site on MHC, which corresponds to the Ser1708, is adjacent to Leu1706 residue known to be mutated (L1706P) in Laing early onset distal myopathy.²⁷ Moreover, several O-GlcNAc sites were also identified on Kelch-12 domain in titin from mouse, corresponding to the Immunoglobulin-like domain 123 in human.²⁹ Titin is essential to sarcomere organization; a decrease in its expression was associated to changes of sarcomere structure, closely linked to a decrease in muscle performance in an hindlimb-unloading rat model.¹⁰⁸ Interestingly, the O-GlcNAc site is located onto a crucial region for myosin polymerization and sarcomere assembly since it interacts with MHC and MyBP-C.⁵ Also, some O-GlcNAc sites have been identified into the PxxP domain of BAG3, and in the plakin domain repeat B5 of plectin known to interact with SH3-containing proteins and intermediate filament proteins respectively.²⁹

Recently, it has been shown that O-GlcNAcylation could be involved in neuromuscular diseases.¹⁰⁹ In particular, it was demonstrated on human skeletal muscle biopsies that the O-GlcNAcylation signal seemed to be relocalized within fibres from patients suffering from muscular dystrophies, rhabdomyolysis, myositis, distal myopathies with rimmed vacuoles, sporadic inclusion body myositis and neurogenic muscular dystrophy. The O-GlcNAcylation involvement in the physiopathology of muscular disorders is also supported by the mapping of O-GlcNAc sites, as previously mentioned for Laing myopathy. In addition, an O-GlcNAcylation site was also mapped on Ser459 of desmin.²⁹ This site corresponds to Ser460 in human, known to be mutated in desminopathy.⁹⁵ Interestingly, SW13 cells transfected with desmin S460I mutant exhibited short desmin filaments, with irregular diameter and prominent aggregations randomly distributed in the cytoplasm, although C2C12 transfected cells did not seem to show abnormal desmin organization.⁹⁵ Moreover, patients with S460I desmin mutant displayed large autophagic vacuoles in muscle fibres.⁹⁵ Desminopathies are classified as myofibrillar myopathies and are characterized by a myofibrillar

disorganization, especially from the Z-disk, an alteration of protein-protein interactions, many aggregations of myofibrillar products degradation and an ectopic expression of some proteins¹¹⁰ leading to skeletal muscle and cardiac impairments. It is important to note that a modulation of the O-GlcNAc moiety could be involved in this pathogenicity. In addition, other genes are known to cause myofibrillar myopathies, such as genes coding for α B-crystallin, myotilin, ZASP, filamin C, BAG3, FHL1 (Four and a Half LIM domains protein 1) or plectin among others.¹¹⁰ Although some of these proteins are known to be O-GlcNAc modified,²⁹ the role of some O-GlcNAc sites of interest have to be considered in the context of skeletal muscle diseases in the future.

4 | SUMMARY AND PERSPECTIVES

More and more studies strongly support the meaningful roles of O-GlcNAcylation in the skeletal muscle physiology, in particular the modulation of muscle contraction through calcium activation parameters, and the sarcomere structure among other cellular processes which were not considered in this review, such as cellular stress, muscle metabolism or myogenesis (for recent review⁶²).

In this review, we focused on contractile and structural proteins of the sarcomere. However, from our recent study, many O-GlcNAcylated proteins of skeletal muscle cells (ie, signalling proteins, transcription factors, epigenetic regulators) are also located in other compartments (ie, nucleus, mitochondria), or are intended to go to these areas and might have a significant impact on the physiology of skeletal muscle.²⁹ For example, a conditional skeletal muscle OGT knock-out mouse model has been recently made and did not change the force production of the muscle but altered its tissue composition, glucose metabolism and production of interleukin-15. The mice were less active and had higher whole-body expenditure. In skeletal muscle, O-GlcNAcylation of the histone-lysine-N-methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) represses the expression of *IL-15*.¹¹¹ Thus, it will be interesting to see the impact of conditional and specific knock-out of different OGT and OGA isoforms in the skeletal muscle physiology. Moreover, proteins known to have a primary role in the sarcomere and regulation of contraction might also be located to other compartments. For example, troponin T3 (full-length and fragmented forms from calpain 3 cleavage) can localize to the nuclei of skeletal muscle as well, closely associated with RNA polymerase activity and nucleolar regions regulating apoptosis and functioning as a transcription factors of genes involved in excitation-contraction coupling.^{112,113} This phenomenon has been shown to be associated with sarcopenia.^{112,113} Interestingly, troponin T is known to be O-GlcNAcylated in skeletal muscle, but its function has not been yet investigated in this context.

From this review, O-GlcNAcylation seems to exert a key role in the sarcomeric cytoskeleton equilibrium; however, it is well established that the sarcomere is not only fundamental for the generation of force but is now considered as a nodal point for transduction involved in diseases and a target for pharmacological intervention. Therefore, it would be essential to better understand the role of O-GlcNAcylation in muscle function, including the organization and the reorganization of sarcomeric cytoskeleton, among other mechanisms, and to clarify its involvement in different pathologies. Indeed, the fine characterization of the impact of O-GlcNAcylation in skeletal muscle will allow the emergence of new therapeutics to limit or reverse the muscle dysfunction closely associated to muscular or neuromuscular diseases, but also resulting from other pathologies (such as diabetes, heart failure or cancer) or physiological changes (such as ageing for example).

What we described in this review might only be the “tip of the iceberg” regarding the role of O-GlcNAcylation in the physio(patho)logy of skeletal muscle. Whether it's from global studies interested in O-GlcNAc variations or recent targeted studies focused on identifying O-GlcNAc proteins and mapping O-GlcNAc sites utilizing inventive biochemistry and mass spectrometry techniques, there has been great progress in characterizing O-GlcNAcylation's role in skeletal muscle physiology. In addition to computational prediction of O-GlcNAc sites (for available platforms¹¹⁴), precise O-GlcNAc sites identification studies need to be pursued in the near future. This would be one of the keys to understand O-GlcNAcylation role on a protein of interest and then within the whole cell, especially in the context of crosstalk with other post-translational modifications, such as phosphorylation or ubiquitination; most of O-GlcNAc residues already identified have not yet established a role in the O-GlcNAc-mediated skeletal physiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank James Conner (Division of Genetics and Genomics, Boston Children's Hospital) for proofreading this manuscript. This work was supported by grants from the Région Nord-Pas-de-Calais (Emergent Research Project n° 12003803) and the AFM-Téléthon (Research grant 21011 DESMINO-GlcNAc). Matthias Lambert is a recipient from the French Ministry for Research and Tertiary Education. Charlotte Claeysen is a recipient from the AFM-Téléthon (PhD Fellowship #22054)

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ORCID

Caroline Cieniewski-Bernard  <https://orcid.org/0000-0003-1449-0357>

REFERENCES

- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.
- Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(1):39-46.
- Gautel M, Djinić-Carugo K. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. *J Exp Biol.* 2016;219(2):135-145.
- Gordon A, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 2000;80(2):853-924.
- Kontogianni-konstantopoulos A, Ackermann MA, Bowman AL. Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1217-1267.
- Boonyarom O, Inui K. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol.* 2006;188(2):77-89.
- Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. Overview of the muscle cytoskeleton. *Compr Physiol.* 2017;7(3):891-944.
- Sanger JW, Wang J, Fan Y, White J, Sanger JM. Assembly and dynamics of myofibrils. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:858606.
- Sadikot T, Hammond CR, Ferrari MB. Distinct roles for telethonin N-versus C-terminus in sarcomere assembly and maintenance. *Dev Dyn.* 2010;239(4):1124-1135.
- Obermann WM, Gautel M, Weber K, Fürst DO. Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J.* 1997;16(2):211-220.
- Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(9):679-689.
- Huang X, Li J, Foster D, et al. Protein kinase C-mediated desmin phosphorylation is related to myofibril disarray in cardiomyopathic hamster heart 1. *Exp Biol Med.* 2002;227(11):1039-1046.
- Ackermann MA, Kontogianni-Konstantopoulos A. Myosin binding protein-C slow is a novel substrate for protein kinase A (PKA) and C (PKC) in skeletal muscle. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4547-4555.
- Stull JT, Kamm KE, Vandenboom R. Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 2011;510(2):120-128.
- Vandenboom R. Modulation of skeletal muscle contraction by myosin phosphorylation. *Compr Physiol.* 2016;7(1):171-212.
- Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* 1984;259(5):3308-3317.
- Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol.* 2015;208(7):869-880.
- Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med.* 2016;51:1-15.
- Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(7):452-465.

20. Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 1990;265(5):2563-2568.
21. Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 1992;267(13):9005-9013.
22. Dong DL, Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem.* 1994;269(30):19321-19330.
23. Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. Dynamic O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *J Biol Chem.* 2001;276(13):9838-9845.
24. Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski J-C. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(6):577-585.
25. Cieniewski-Bernard C, Montel V, Berthoin S, Bastide B. Increasing O-GlcNAcylation level on organ culture of soleus modulates the calcium activation parameters of muscle fibers. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e48218.
26. Hedou J, Cieniewski-Bernard C, Leroy Y, Michalski J-C, Mounier Y, Bastide B. O-linked N-acetylglucosamylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10360-10369.
27. Hédou J, Bastide B, Page A, Michalski J-C, Morelle W. Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics.* 2009;9(8):2139-2148.
28. Lambert M, Richard E, Duban-Deweere S, et al. O-GlcNAcylation is a key modulator of skeletal muscle sarcomeric morphometry associated to modulation of protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta—Gen Subj.* 2016;1860(9):2017-2030.
29. Deracinois B, Camoin L, Lambert M, et al. O-GlcNAcylation site mapping by (azide-alkyne) click chemistry and mass spectrometry following intensive fractionation of skeletal muscle cells proteins. *J Proteomics.* 2018;186:83-97.
30. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(3):183-195.
31. Kooij V, Stienen G, van der Velden J. The role of protein kinase C-mediated phosphorylation of sarcomeric proteins in the heart—detrimental or beneficial? *Biophys Rev.* 2011;3(3):107-117.
32. Mounier R, Théret M, Lantier L, Foretz M, Viollet B. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(6):275-286.
33. Reimann L, Wiese H, Leber Y, et al. Myofibrillar Z-discs are a protein phosphorylation hot spot with protein Kinase C (PKC α) modulating protein dynamics. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16(3):346-367.
34. Kischel P, Bastide B, Potter JD, Mounier Y. The role of the Ca(2+) regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca(2+) sensitizer bepridil. *Br J Pharmacol.* 2000;131(7):1496-1502.
35. Cieniewski-Bernard C, Montel V, Stevens L, Bastide B. O-GlcNAcylation, an original modulator of contractile activity in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009;30(7–8):281-287.
36. Cieniewski-Bernard C, Lambert M, Dupont E, Montel V, Stevens L, Bastide B. O-GlcNAcylation, contractile protein modifications and calcium affinity in skeletal muscle. *Front Physiol.* 2014;5:1-7.
37. Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction: interference microscopy of living muscle fibres. *Nature.* 1954;173(4412):971-973.
38. Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature.* 1954;173(4412):973-976.
39. Herzberg O, Moulton J, James MN. Calcium binding to skeletal muscle troponin C and the regulation of muscle contraction. *Ciba Found Symp.* 1986;122:120-144.
40. Lehman W, Craig R, Vibert P. Ca²⁺-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature.* 1994;368(6466):65-67.
41. Blumenthal DK, Stull JT. Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium(2+) and calmodulin. *Biochemistry.* 1980;19(24):5608-5614.
42. Lowey S, Trybus KM. Common structural motifs for the regulation of divergent class II myosins. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16403-16407.
43. Greenberg MJ, Mealy TR, Watt JD, Jones M, Szczesna-Cordary D, Moore JR. The molecular effects of skeletal muscle myosin regulatory light chain phosphorylation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(2):R265-R274.
44. Persechini A, Stull JT, Cooke R. The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J Biol Chem.* 1985;260(13):7951-7954.
45. Szczesna D, Zhao J, Jones M, Zhi G, Stull J, Potter JD. Phosphorylation of the regulatory light chains of myosin affects Ca²⁺ sensitivity of skeletal muscle contraction. *J Appl Physiol.* 2002;92(4):1661-1670.
46. Sweeney HL, Stull JT. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(1):414-418.
47. Padrón R, Panté N, Sosa H, Kendrick-Jones J. X-ray diffraction study of the structural changes accompanying phosphorylation of tarantula muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 1991;12(3):235-241.
48. Levine RJ, Kensler RW, Yang Z, Stull JT, Sweeney HL. Myosin light chain phosphorylation affects the structure of rabbit skeletal muscle thick filaments. *Biophys J.* 1996;71(2):898-907.
49. Levine RJ, Yang Z, Epstein ND, Fananapazir L, Stull JT, Sweeney HL. Structural and functional responses of mammalian thick filaments to alterations in myosin regulatory light chains. *J Struct Biol.* 1998;122(1–2):149-161.
50. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem.* 2004;259(1–2):197-209.
51. Hartshorne DJ, Ito M, Erdödi F. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37211-37214.
52. Ramirez-Correa GA, Jin W, Wang Z, et al. O-linked GlcNAc modification of cardiac myofibrillar proteins: A novel regulator of myocardial contractile function. *Circ Res.* 2008;103(12):1354-1358.
53. Cieniewski-Bernard C, Dupont E, Richard E, Bastide B. Phospho-GlcNAc modulation of slow MLC2 during soleus atrophy through a multienzymatic and sarcomeric complex. *Pflügers Arch—Eur J Physiol.* 2014;466(11):2139-2151.

54. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:825-858.
55. Hortemo KH, Aronsen JM, Lunde IG, Sjaastad I, Lunde PK, Sejersted OM. Exhausting treadmill running causes dephosphorylation of sMLC2 and reduced level of myofilament MLCK2 in slow twitch rat soleus muscle. *Physiol Rep.* 2015;3(2):e12285-e12285.
56. Hortemo KH, Lunde PK, Anonsen JH, et al. Exercise training increases protein O-GlcNAcylation in rat skeletal muscle. *Physiol Rep.* 2016;4(18):e12896.
57. Vandenoorn R, Gittings W, Smith IC, Grange RW, Stull JT. Myosin phosphorylation and force potentiation in skeletal muscle: evidence from animal models. *J Muscle Res Cell Motil.* 2013;34(5-6):317-332.
58. Munkvik M, Lunde PK, Sejersted OM. Causes of fatigue in slow-twitch rat skeletal muscle during dynamic activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(3):R900-R910.
59. Hortemo KH, Munkvik M, Lunde PK, Sejersted OM. Multiple causes of fatigue during shortening contractions in rat slow twitch skeletal muscle. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e71700.
60. Peternelj TT, Marsh SA, Strobel NA, et al. Glutathione depletion and acute exercise increase O-GlcNAc protein modification in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem.* 2015;400(1-2):265-275.
61. Cieniewski-Bernard C, Mounier Y, Michalski J-C, Bastide B. O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol.* 2006;100(5):1499-1505.
62. Lambert M, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. Involvement of O-GlcNAcylation in the skeletal muscle physiology and physiopathology: focus on muscle metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:578.
63. Ramirez-Correa GA, Ma J, Slawson C, et al. Removal of abnormal myofilament O-GlcNAcylation restores Ca²⁺ sensitivity in diabetic cardiac muscle. *Diabetes.* 2015;64(10):3573-3587.
64. Stevens L, Bastide B, Hedou J, et al. Potential regulation of human muscle plasticity by MLC2 post-translational modifications during bed rest and countermeasures. *Arch Biochem Biophys.* 2013;540(1-2):125-132.
65. Mounier Y, Tiffreau V, Montel V, Bastide B, Stevens L. Phenotypical transitions and Ca²⁺ activation properties in human muscle fibers: effects of a 60-day bed rest and countermeasures. *J Appl Physiol.* 2009;106(4):1086-1099.
66. Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL, Mounier Y. Effects of beta(2)-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(3):C582-C588.
67. Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, Reggiani C. Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am J Physiol Physiol.* 2003;285(3):C575-C583.
68. Gannon J, Doran P, Kirwan A, Ohlendieck K. Drastic increase of myosin light chain MLC-2 in senescent skeletal muscle indicates fast-to-slow fibre transition in sarcopenia of old age. *Eur J Cell Biol.* 2009;88(11):685-700.
69. Fülöp N, Feng W, Xing D, et al. Aging leads to increased levels of protein O-linked N-acetylglucosamine in heart, aorta, brain and skeletal muscle in Brown-Norway rats. *Biogerontology.* 2008;9(3):139.
70. Metzger JM, Westfall MV. Covalent and noncovalent modification of thin filament action: the essential role of troponin in cardiac muscle regulation. *Circ Res.* 2004;94(2):146-158.
71. Bayliss CR, Jacques AM, Leung M-C, et al. Myofibrillar Ca²⁺ sensitivity is uncoupled from troponin I phosphorylation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy due to abnormal troponin T. *Cardiovasc Res.* 2013;97(3):500-508.
72. Buscemi N, Foster DB, Neverova I, Van Eyk JE. p21-activated kinase increases the calcium sensitivity of rat triton-skinned cardiac muscle fiber bundles via a mechanism potentially involving novel phosphorylation of troponin I. *Circ Res.* 2002;91(6):509-516.
73. Salhi HE, Hassel NC, Siddiqui JK, et al. Myofilament calcium sensitivity: mechanistic insight into TnI Ser-23/24 and Ser-150 phosphorylation integration. *Front Physiol.* 2016;7:567.
74. Dubois-Deruy E, Belliard A, Mulder P, et al. Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosamylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2015;107(1):56-65.
75. Kowlessur D, Tobacman LS. Low temperature dynamic mapping reveals unexpected order and disorder in troponin. *J Biol Chem.* 2010;285(50):38978-38986.
76. Na I, Kong MJ, Straight S, Pinto JR, Uversky VN. Troponins, intrinsic disorder, and cardiomyopathy. *Biol Chem.* 2016;397(8).
77. Darling AL, Uversky VN. Intrinsic disorder and posttranslational modifications: the darker side of the biological dark matter. *Front Genet.* 2018;9:158.
78. Britto-Borges T, Barton GJ. A study of the structural properties of sites modified by the O-linked 6-N-acetylglucosamine transferase. *PLoS ONE.* 2017;12(9):e0184405.
79. Agarkova I, Perriard J-C. The M-band: an elastic web that cross-links thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 2005;15(9):477-485.
80. Ehler E, Gautel M. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008;642:1-14.
81. Lange S, Ehler E, Gautel M. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol.* 2006;16(1):11-18.
82. Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N. The sarcomeric Z-disc: A nodal point in signalling and disease. *J Mol Med.* 2006;84(6):446-468.
83. Sanger JM, Sanger JW. The dynamic Z bands of striated muscle cells. *Sci Signal.* 2008;1(32):pe37.
84. Hu L-Y, Ackermann MA, Kontogianni-Konstantopoulos A. The sarcomeric M-region: a molecular command center for diverse cellular processes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-25.
85. von Nandelstadh P, Ismail M, Gardin C, et al. A class III PDZ binding motif in the myotilin and FATZ families binds enigma family proteins: a common link for Z-disc myopathies. *Mol Cell Biol.* 2009;29(3):822-834.
86. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res.* 2004;301(1):1-7.
87. Lovering RM, O'Neill A, Muriel JM, Prosser BL, Strong J, Bloch RJ. Physiology, structure, and susceptibility to injury of skeletal muscle in mice lacking keratin 19-based and desmin-based intermediate filaments. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300(4):C803-C813.
88. Winter DL, Paulin D, Mericskay M, Li Z. Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies. *Histochem Cell Biol.* 2014;141(1):1-16.

89. Ise H, Kobayashi S, Goto M, et al. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology*. 2010;20(7):843-864.
90. Hnia K, Ramspacher C, Vermot J, Laporte J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res*. 2014;360(3):591-608.
91. Farach AM, Galileo DS. O-GlcNAc modification of radial glial vimentin filaments in the developing chick brain. *Brain Cell Biol*. 2008;36(5-6):191-202.
92. Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2098-2109.
93. Srikanth B, Vaidya MM, Kalraiya RD. O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *J Biol Chem*. 2010;285(44):34062-34071.
94. Ji S, Kang JG, Park SY, Lee J, Oh YJ, Cho JW. O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids*. 2011;40(3):809-818.
95. Bär H, Goudeau B, Wälde S, et al. Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies. *Hum Mutat*. 2007;28(4):374-386.
96. Herrmann H, Häner M, Brettel M, et al. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol*. 1996;264(5):933-953.
97. Heimburg T, Schuenemann J, Weber K, Geisler N. Specific recognition of coiled coils by infrared spectroscopy: analysis of the three structural domains of type III intermediate filament proteins. *Biochemistry*. 1996;35(5):1375-1382.
98. Goldfarb LG, Olivé M, Vicart P, Goebel HH. Intermediate filament diseases: desminopathy. *Adv Exp Med Biol*. 2008;642:131-164.
99. Rogers KR, Eckelt A, Nimmrich V, et al. Truncation mutagenesis of the non-alpha-helical carboxyterminal tail domain of vimentin reveals contributions to cellular localization but not to filament assembly. *Eur J Cell Biol*. 1995;66(2):136-150.
100. Elliott JL, Der Perng M, Prescott AR, Jansen KA, Koenderink GH, Quinlan RA. The specificity of the interaction between α B-crystallin and desmin filaments and its impact on filament aggregation and cell viability. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1617):20120375.
101. Sharma S, Conover GM, Elliott JL, Der Perng M, Herrmann H, Quinlan RA. α B-crystallin is a sensor for assembly intermediates and for the subunit topology of desmin intermediate filaments. *Cell Stress Chaperones*. 2017;22(4):613-626.
102. Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, et al. Mimicking phosphorylation of α B-crystallin affects its chaperone activity. *Biochem J*. 2007;401(1):129-141.
103. Bakthisaran R, Akula KK, Tangirala R, Rao CM. Biochimica et biophysica acta phosphorylation of α B-crystallin: role in stress, aging and patho-physiological conditions. *BBA—Gen Subj*. 2016;1860(1):167-182.
104. Krishnamoorthy V, Donofrio AJ, Martin JL. O-GlcNAcylation of α B-crystallin regulates its stress-induced translocation and cytoprotection. *Mol Cell Biochem*. 2013;379(1-2):59-68.
105. Houck SA, Landsbury A, Clark JI, Quinlan RA. Multiple sites in α B-crystallin modulate its interactions with desmin filaments assembled in vitro. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e25859.
106. Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J. α B-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ Res*. 2003;93(10):998-1005.
107. Andley UP, Hamilton PD, Ravi N, Wehl CC. A knock-in mouse model for the R120G mutation of α B-crystallin recapitulates human hereditary myopathy and cataracts. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17671.
108. Udaka J, Ohmori S, Terui T, et al. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *J Gen Physiol*. 2008;131(1):33-41.
109. Nakamura S, Nakano S, Nishii M, Kaneko S, Kusaka H. Localization of O-GlcNAc-modified proteins in neuromuscular diseases. *Med Mol Morphol*. 2012;45(2):86-90.
110. Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2013;125(1):47-75.
111. Shi H, Munk A, Nielsen TS, et al. Skeletal muscle O-GlcNAc transferase is important for muscle energy homeostasis and whole-body insulin sensitivity. *Mol Metab*. 2018;11:160-177.
112. Johnston JR, Chase PB, Pinto JR. Troponin through the looking-glass: emerging roles beyond regulation of striated muscle contraction. *Oncotarget*. 2018;9(1):1461-1482.
113. Pinto JR, Muller-Delp J, Chase PB. Will you still need me (Ca²⁺, TnT, and DHPR), will you still cleave me (calpain), when I'm 64? *Aging Cell*. 2017;16(2):202-204.
114. Jia C, Zuo Y. Computational prediction of protein O-GlcNAc modification. *Methods Mol Biol*. 2018;1754:235-246.

How to cite this article: Lambert M, Claeysen C, Bastide B, Cieniewski-Bernard C. O-GlcNAcylation as a regulator of the functional and structural properties of the sarcomere in skeletal muscle: An update review. *Acta Physiol*. 2020;228:e13301. <https://doi.org/10.1111/apha.13301>

Posters

O-GlcNAcylation impact desmin phosphorylation and partition toward cytoskeleton in C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes

Charlotte CLAEYSSEN, Bruno BASTIDE, Caroline CIENIEWSKI-BERNARD

URPSSS – ULR7369 Physical Activity, Muscle, Health – University of Lille, France

✉ charlotte.claeyssen.etu@univ-lille.fr

BACKGROUND



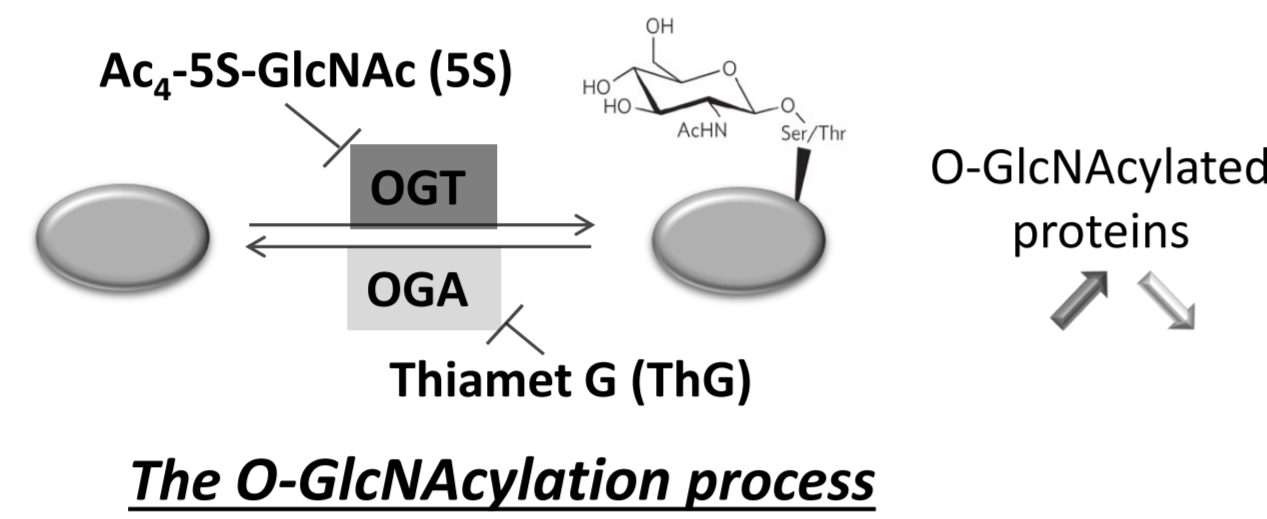
O-GlcNAcylation is an atypical glycosylation akin to phosphorylation. Dynamic and reversible, the O-GlcNAcylation modifies a plethora of myofibrillar proteins. We have previously demonstrated that O-GlcNAcylation regulated sarcomeric cytoskeleton since the sarcomere morphometry is modified consecutively to O-GlcNAcylation changes, in correlation with modification of the O-GlcNAcylation level of myofibrillar proteins. Moreover, these structural changes partly involved desmin, a key protein of intermediate filaments in striated muscle, and its molecular chaperone, the α B-crystallin. We focused herein on the effect of O-GlcNAcylation changes on the desmin behavior in differentiated myotubes, we focused on its phosphorylation, its partition and its interaction with its molecular chaperone: α B-crystallin

METHODS



C2C12 myotubes – 5-days differentiation
All experiments were done on C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes

Increase or decrease of the global O-GlcNAcylation level by inhibitors of OGA (Thiamet G) or OGT (Ac₄-5S-GlcNAc)



DOWNSTREAM ANALYSES

Western blot analyses: QUANTIFICATION OF EXPRESSION AND PHOSPHORYLATION OF DESMIN, CamKII, PAK

Phostag-PAGE and western blot: QUANTIFICATION OF VARIATION OF THE NON-PHOSPHORYLATED AND THE PHOSPHORYLATED DESMIN ACCORDING TO THE NUMBER OF PHOSPHATE MOIETIES

Immunoprecipitation of O-GlcNAcyated proteins and western blot analyses: VARIATION OF O-GlcNAcylation OF DESMIN

Differential protein extraction: QUANTIFICATION OF THE PARTITION OF DESMIN AND α B-CRYSTALLIN

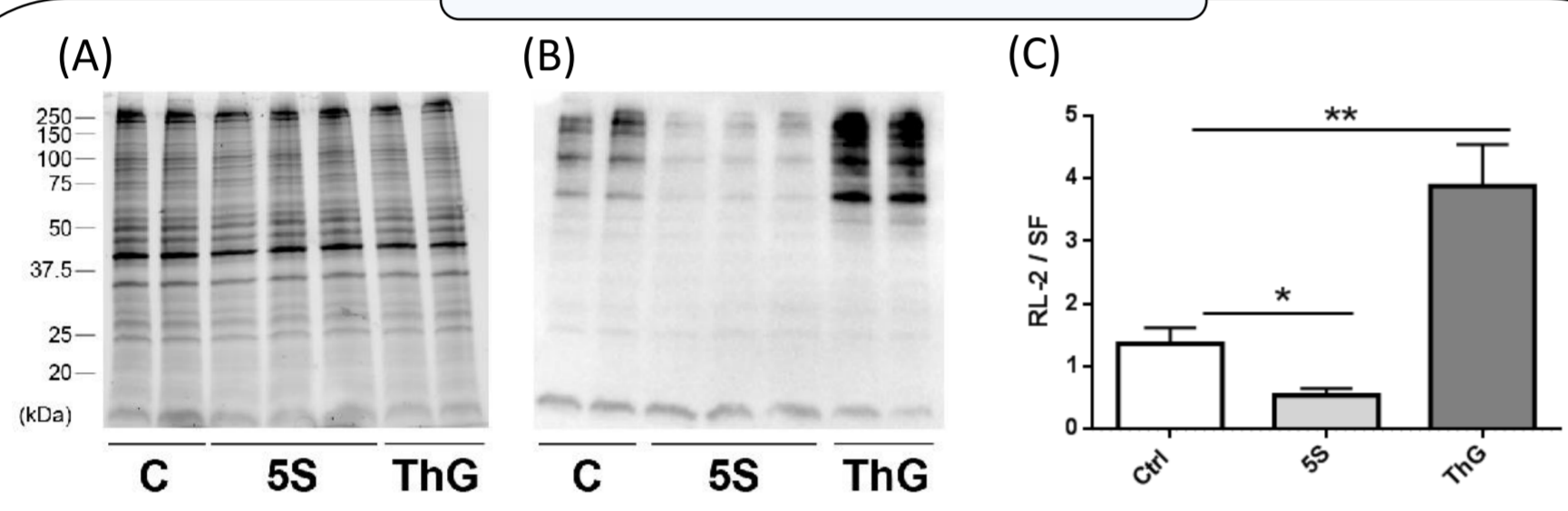
WGA-PAGE and western blot: QUANTIFICATION OF VARIATION OF THE NON-GLYCOSYLATED AND THE O-GLCNAcyATED DESMIN ACCORDING TO THE NUMBER OF O-GLCNAc MOIETIES

Co-immunoprecipitation of desmin and its protein partners: QUANTIFICATION OF THE INTERACTION BETWEEN DESMIN AND α B-CRYSTALLIN

MAJOR RESULTS

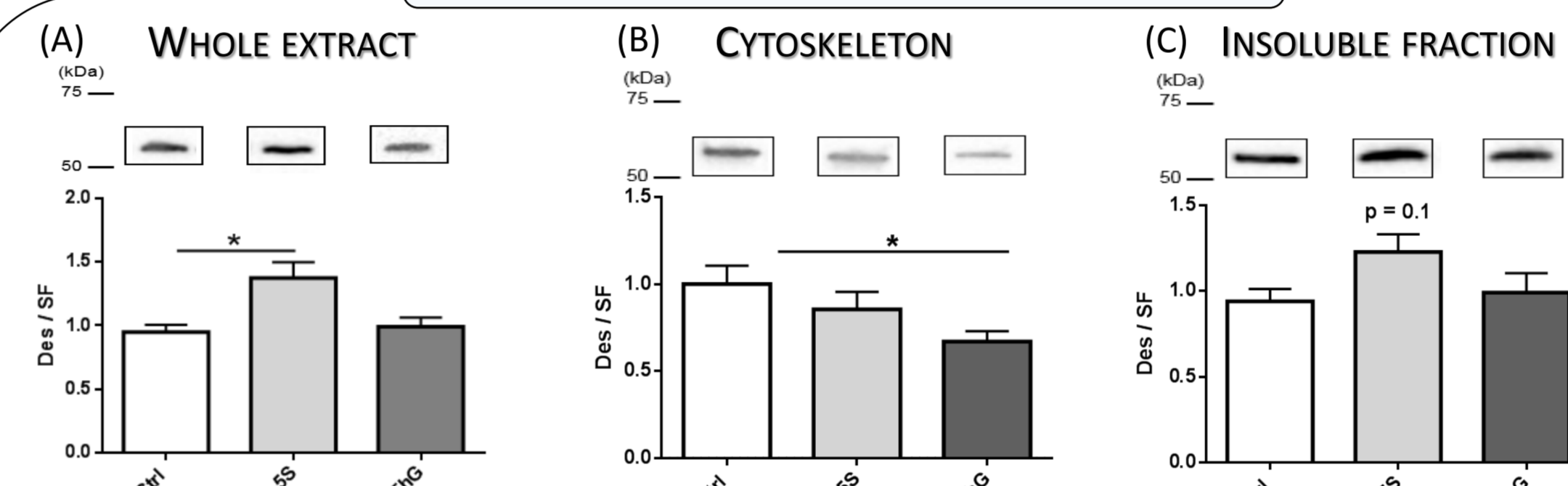


TREATMENTS VALIDATION



➤ Significant variations of O-GlcNAcylation level

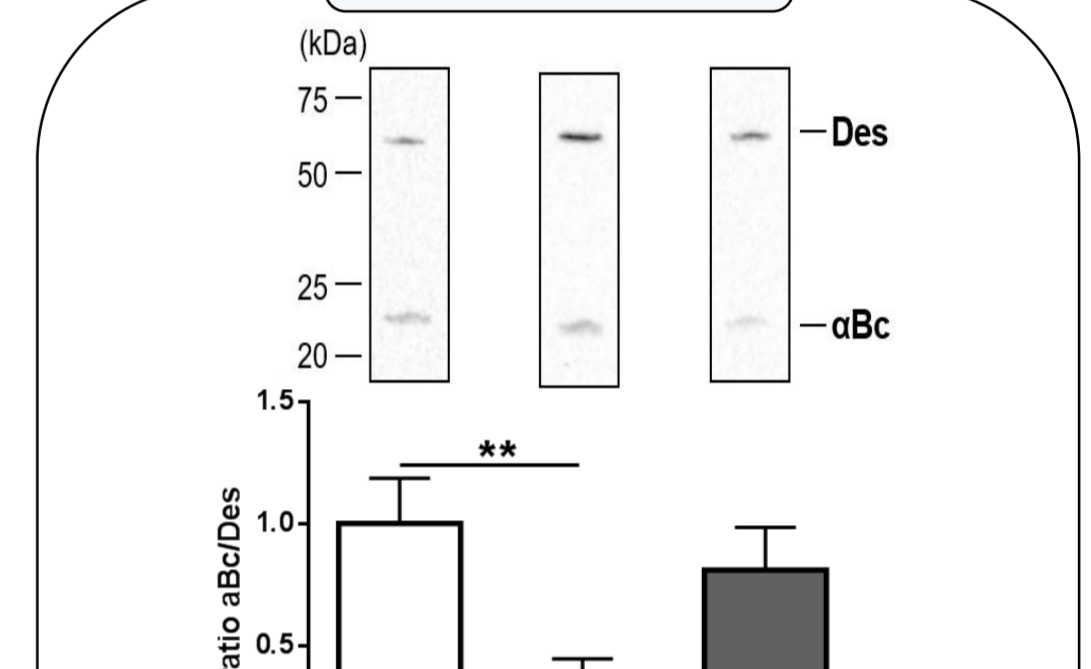
DESMIN EXPRESSION AND PARTITION



Desmin expression detected by western-blot in whole extract (A). Differential extraction protocols were applied and desmin was detected toward cytoskeleton (B) and in insoluble material (C)

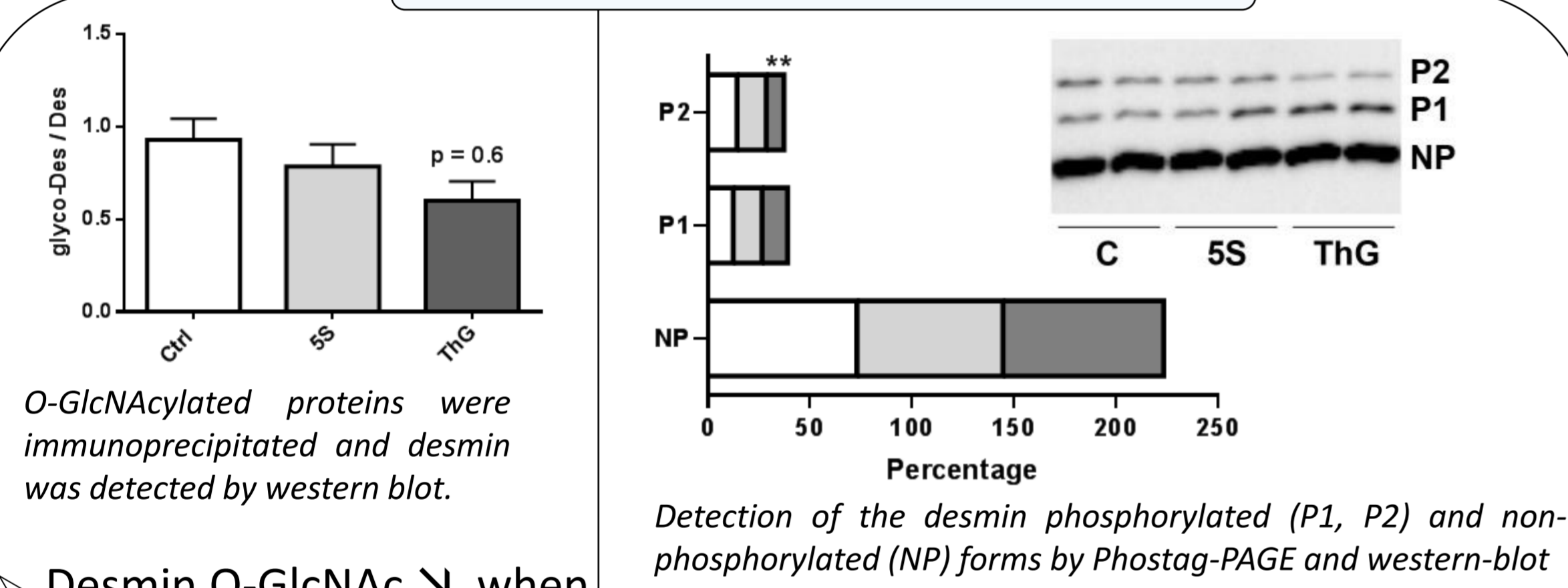
➤ Desmin expression and partition changes according to the global O-GlcNAcylation level

INTERACTION



➤ Interaction Des/ α Bc \searrow when global O-GlcNAcylation \searrow

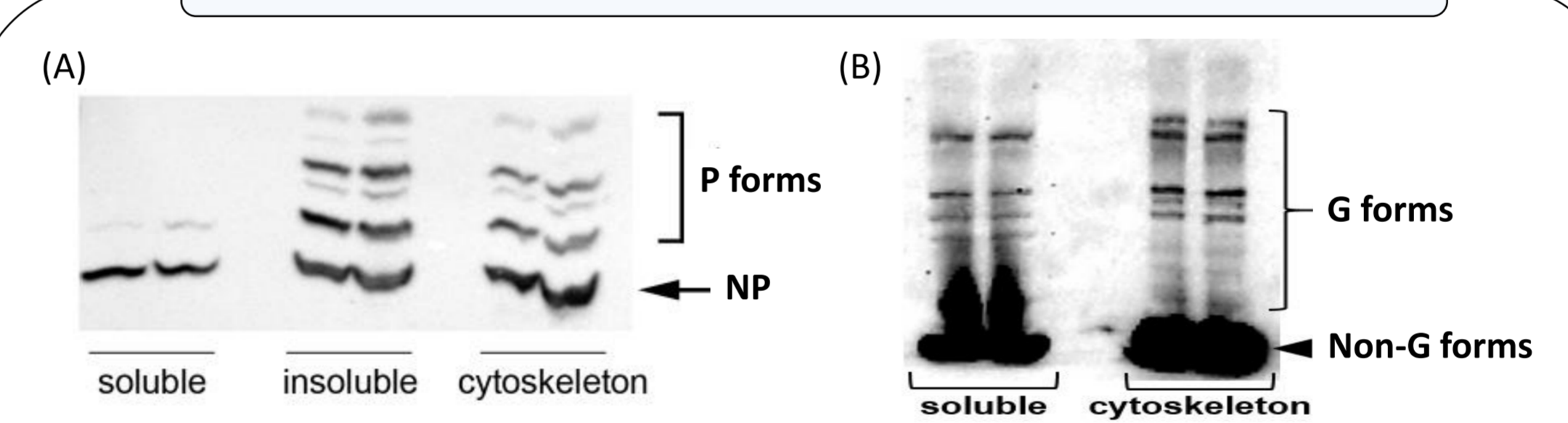
O-GLCNAcylation / PHOSPHORYLATION



➤ Desmin O-GlcNAc \searrow when global O-GlcNAcylation \nearrow

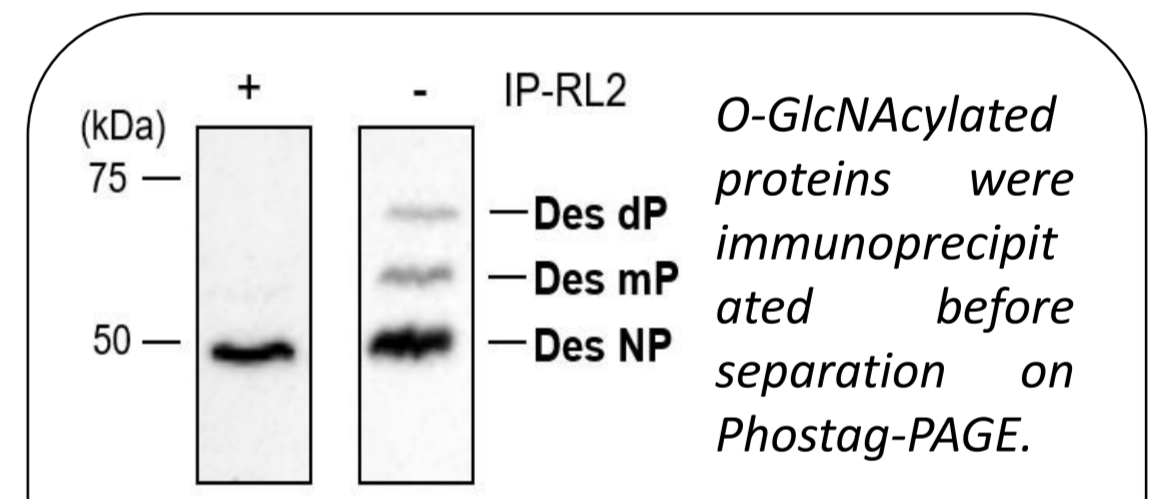
➤ Desmin phosphorylation \searrow when global O-GlcNAcylation \nearrow

POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND PARTITION



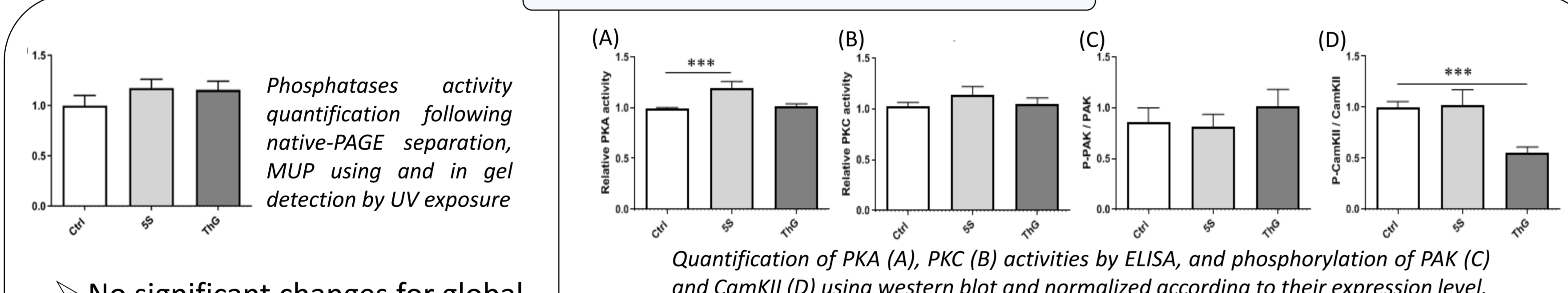
Detection of phosphorylation pattern of desmin after Phostag-PAGE (A) and the different O-GlcNAcyated forms of desmin following WGA-PAGE (B) and western-blot in soluble, insoluble and cytoskeleton. P forms: phosphorylated forms; G forms: glycosylated forms

➤ O-GlcNAcylation and phosphorylation can act on desmin partition



➤ O-GlcNAc and phosphorylation are mutually exclusive

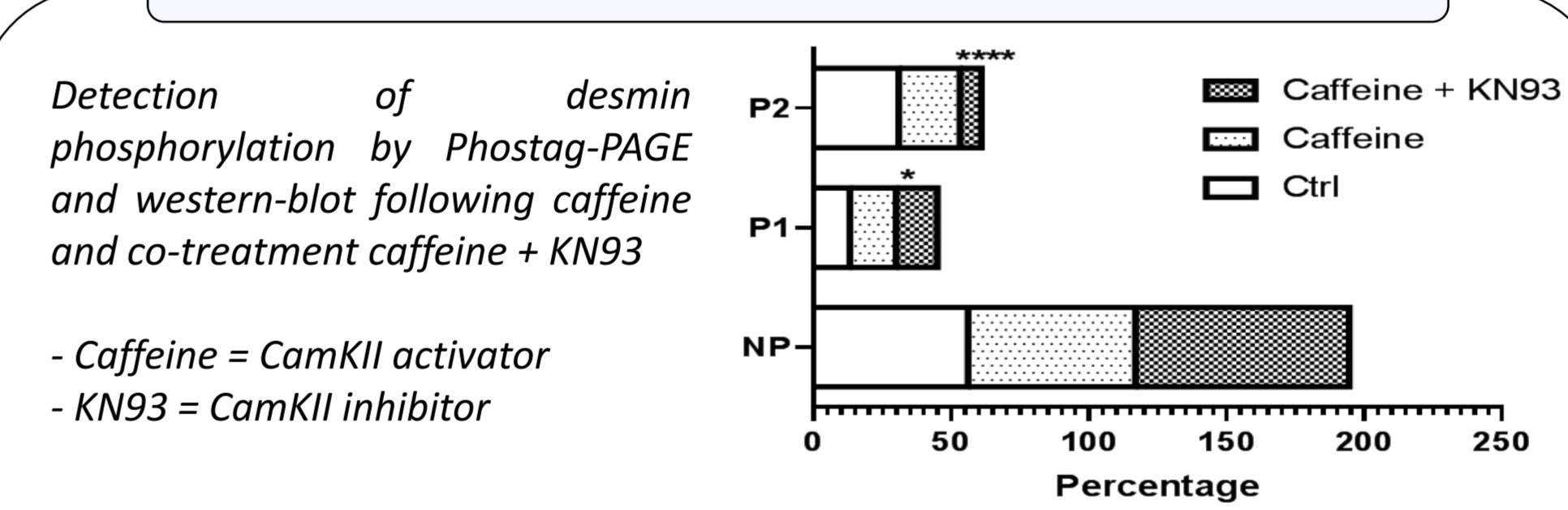
PHOSPHATASES AND KINASES ACTIVITIES



➤ No significant changes for global desmin phosphatases activities

➤ Desmin kinases activities changes according to the global O-GlcNAc level

CAMKII ACTIVITY AND DESMIN PHOSPHORYLATION



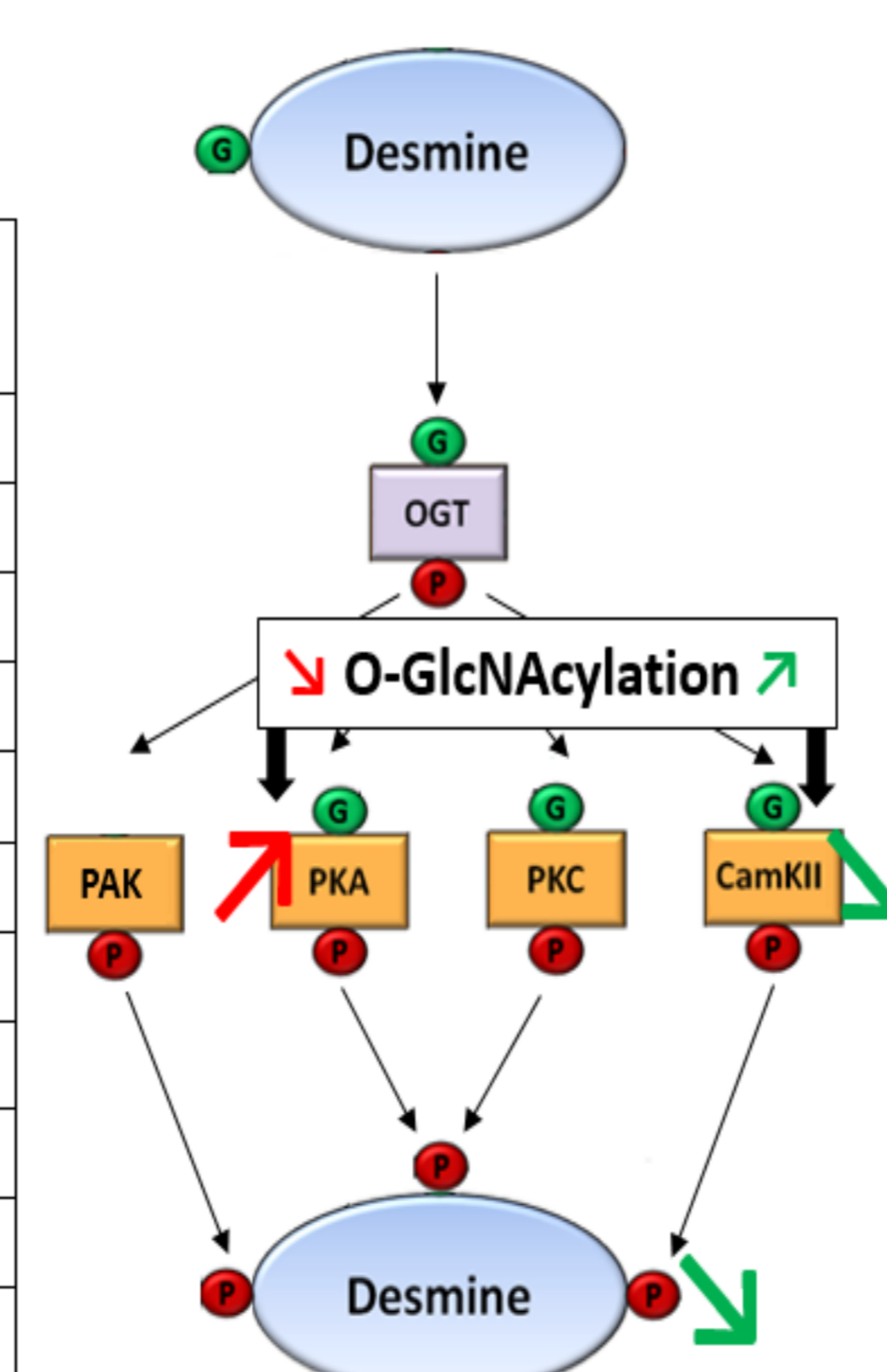
➤ CamKII could be involved in the regulation of desmin phosphorylation

Statistical significance \Rightarrow **** : $p < 0,0001$; *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$

SUMMARY



	Ac ₄ -5S-GlcNAc-treated myotubes	Thiamet G-treated myotubes
Global O-GlcNAcylation level	\searrow^*	\nearrow^*
Desmin expression	\nearrow^*	=
Partition	Cytoskeleton	\searrow^*
	Insoluble	\nearrow^*
Desmin - α B-crystallin interaction	\searrow^{**}	=
Desmin O-GlcNAcylation	=	\searrow^*
Desmin phosphorylation	=	\searrow^*
Kinases activity	PKA	\nearrow^{***}
	PKC	=
	CamKII	\searrow^{***}
	PAK	=
Phosphatases activity	=	=



Global O-GlcNAcylation changes on C2C12 myotubes impact :

- ✓ Expression of desmin
- ✓ Changes on desmin partition towards cytoskeletal and insoluble material
- ✓ O-GlcNAcylation and phosphorylation levels of desmin
- ✓ Modification desmin / α B-crystallin interaction
- ✓ Modulation of kinases activities involved in desmin phosphorylation

O-GlcNAcylation is a key regulator of the organization and reorganization of sarcomeric cytoskeleton, in particular the intermediate filaments of desmin

ACKNOWLEDGEMENTS



This work was supported by the AFM-Téléthon (research grant 21011, project DESMINO-GlcNAc and PhD fellowship 22054)

BACKGROUND



O-GlcNAcylation is an atypical glycosylation akin to phosphorylation. Dynamic and reversible, the O-GlcNAcylation modifies a plethora of myofibrillar proteins. We have previously demonstrated that O-GlcNAcylation regulated sarcomeric cytoskeleton since the sarcomere morphometry is modified consecutively to O-GlcNAcylation changes, in correlation with modification of the O-GlcNAcylation level of myofibrillar proteins. Moreover, these structural changes partly involved desmin, a key protein of intermediate filaments in striated muscle, and its molecular chaperone, the α B-crystallin. We focused herein on the effect of O-GlcNAcylation changes on the desmin behavior in differentiated myotubes, as well as its molecular chaperone, the α B-crystallin.

METHODS

C2C12 myotubes – 5-days differentiation

All experiments were done on C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes

Increase or decrease of the global O-GlcNAcylation level by inhibitors of OGA (Thiamet G) or OGT (Ac₂-5S-GlcNAc)

The O-GlcNAcylation process

DOWNSTREAM ANALYSES

- Western blot analyses: QUANTIFICATION OF EXPRESSION OF DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Differential protein extraction: QUANTIFICATION OF THE PARTITION OF DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Co-immunoprecipitation of desmin and its protein partners: QUANTIFICATION OF THE INTERACTION BETWEEN DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Immunoprecipitation of O-GlcNAcylated proteins and western blot analyses: QUANTIFICATION OF VARIATION OF O-GlcNAcylation ON DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Phos-Tag electrophoresis and western blot: QUANTIFICATION OF VARIATION OF THE NON-PHOSPHORYLATED AND THE PHOSPHORYLATED DESMIN ACCORDING TO THE NUMBER OF PHOSPHATE MOIETIES
- ELISA assay: QUANTIFICATION OF KINASES ACTIVITY
- In gel detection of MUP after separation by 10% Native-PAGE: QUANTIFICATION OF PHOSPHATASES ACTIVITY
- Immunofluorescence analysis: VISUALISATION OF INTERMEDIATE FILAMENT OF DESMIN

RESULTS

TREATMENTS VALIDATION

Top: Protein profiles of C2C12 extract detected through the Stain-Free technology.

Bottom: O-GlcNAcylated proteins profiles (Western blot using the RL-2 antibody)

Significant variations of O-GlcNAcylation level

DESMIN EXPRESSION

CYTOSKELETON INSOLUBLE FRACTION

Expression of desmin was detected by western blot.

Differential extraction protocols were applied on C2C12 myotubes. Desmin was detected in cytoskeleton and insoluble fractions by western blot.

Changes of the expression and the partitioning of desmin according to the global O-GlcNAcylation level

INTERACTION

Desmin was co-immunoprecipitated in association with its protein partners. Desmin and α B-crystallin were detected by western blot

Interaction Desmin/ α B-crystallin when global O-GlcNAcylation

O-GlcNAcylation

Desmin phosphorylation

Proteins from C2C12 myotubes were separated on Phos-Tag-PAGE to quantify the changes of phosphorylation on the non-phosphorylated (NP), mono- (mP) or di-phosphorylated (dP) forms of desmin.

Desmin phosphorylation when global O-GlcNAcylation

O-GlcNAcylation / PHOSPHORYLATION

O-GlcNAcylated proteins were immunoprecipitated before separation on Phos-Tag-PAGE.

O-GlcNAcylation and phosphorylation are mutually exclusive for desmin

KINASES ACTIVITY

PKA and PKC activity was detected by ELISA assay

Changes of kinases activity depending on the global O-GlcNAcylation level

CamKII activity was detected by western-blot

PHOSPHATASES ACTIVITY

In gel detection of phosphatases activity using a fluorogenic substrate: MUP and after separation by 10% Native-PAGE

No changes of phosphatases activity whatever the treatment applied

FILAMENTS ARCHITECTURE

Visualisation of desmin filaments using confocal microscopy after specific labelling of desmin on untreated or treated myoblastes/myotubes.

Desmin filaments are remodelled consecutively to global O-GlcNAcylation changes

SUMMARY



Global O-GlcNAcylation changes on C2C12 myotubes impact :

- ✓ Expression of desmin and α B-crystallin
- ✓ Differential partitioning of desmin towards insoluble protein materials
- ✓ O-GlcNAcylation and phosphorylation levels of desmin
- ✓ Modulation of the interaction between desmin and α B-crystallin
- ✓ Remodelling of desmin filaments

	Global O-GlcNAcylation \downarrow	Control myotubes	Global O-GlcNAcylation \uparrow
EXPRESSION, O-GlcNAcylation, PHOSPHORYLATION			
INTERACTION			
PARTITIONING WITHIN INSOLUBLE MATERIALS AND CYTOSKELETON			

O-GlcNAcylation is a key regulator of the organization and reorganization of sarcomeric cytoskeleton, in particular the intermediate filaments of desmin

ACKNOWLEDGEMENTS



This work was supported by the AFM-Téléthon (research grant 21011, project DESMINO-GlcNAc and PhD fellowship 22054)

Impact of O-GlcNAcylation changes on desmin behavior in differentiated myotubes

Charlotte CLAEYSSEN, Bruno BASTIDE, Caroline CIENIEWSKI-BERNARD

URPSSS – EA7369 Physical Activity, Muscle, Health – University of Lille, France

✉ charlotte.claeyssen.etu@univ-lille.fr

BACKGROUND



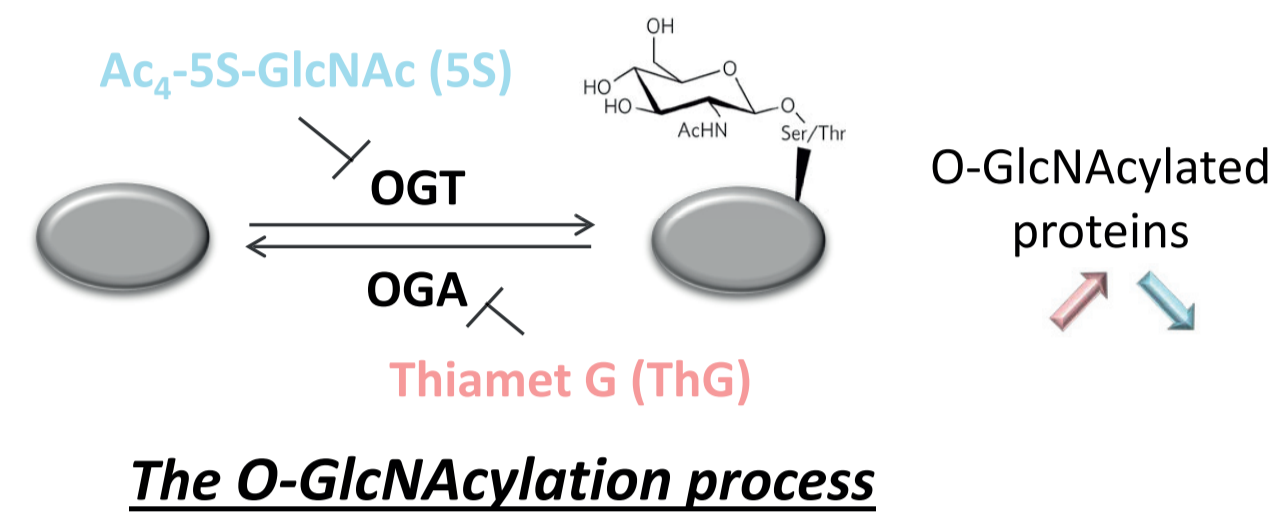
O-GlcNAcylation is an atypical glycosylation akin to phosphorylation. Dynamic and reversible, the O-GlcNAcylation modifies a plethora of myofibrillar proteins. We have previously demonstrated that O-GlcNAcylation regulated sarcomeric cytoskeleton since the sarcomere morphometry is modified consecutively to O-GlcNAcylation changes, in correlation with modification of the O-GlcNAcylation level of myofibrillar proteins. Moreover, these structural changes partly involved desmin, a key protein of intermediate filaments in striated muscle, and its molecular chaperone, the α B-crystallin. We focused herein on the effect of O-GlcNAcylation changes on the desmin behavior in differentiated myotubes, as well as its molecular chaperone, the α B-crystallin.

METHODS

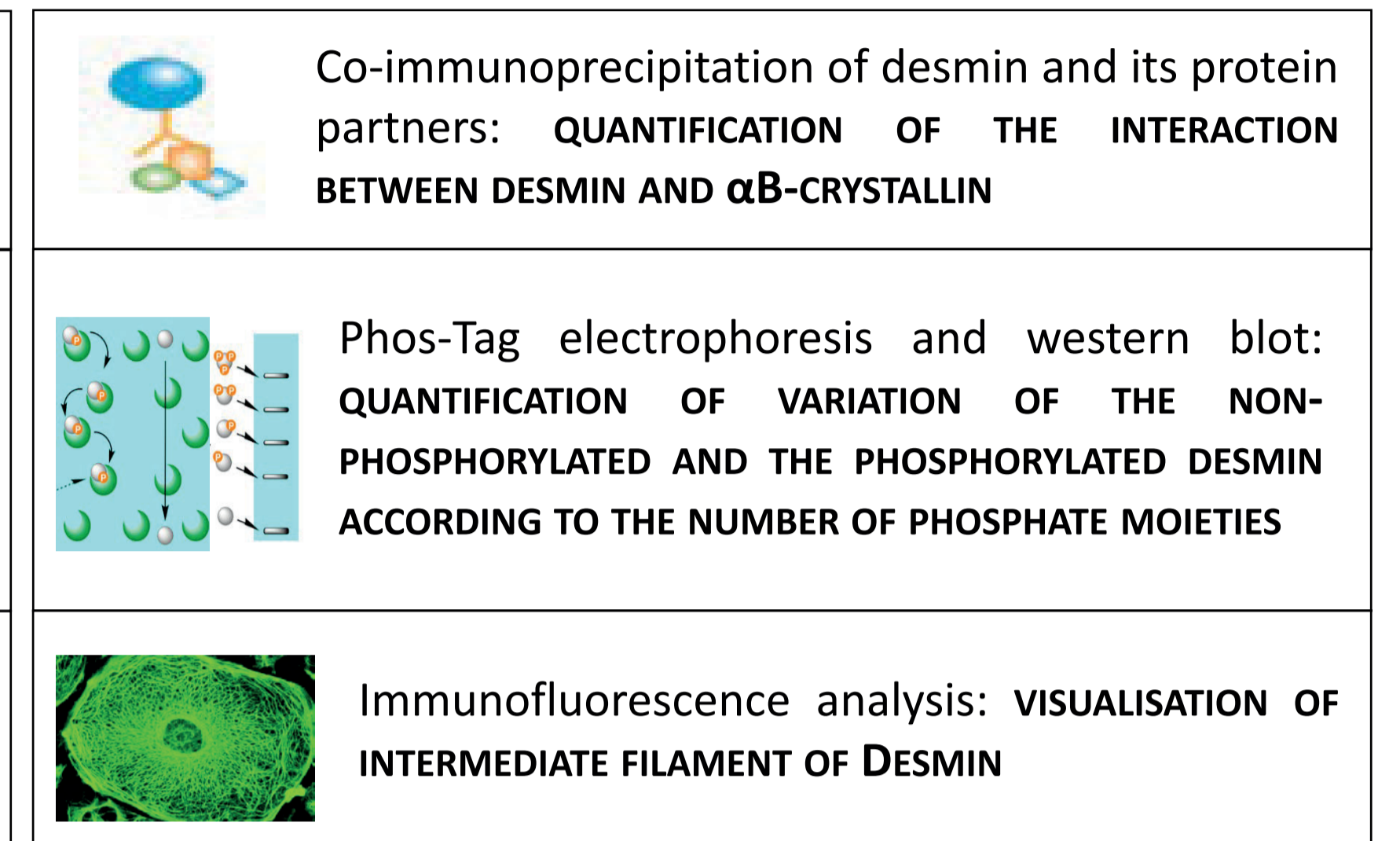
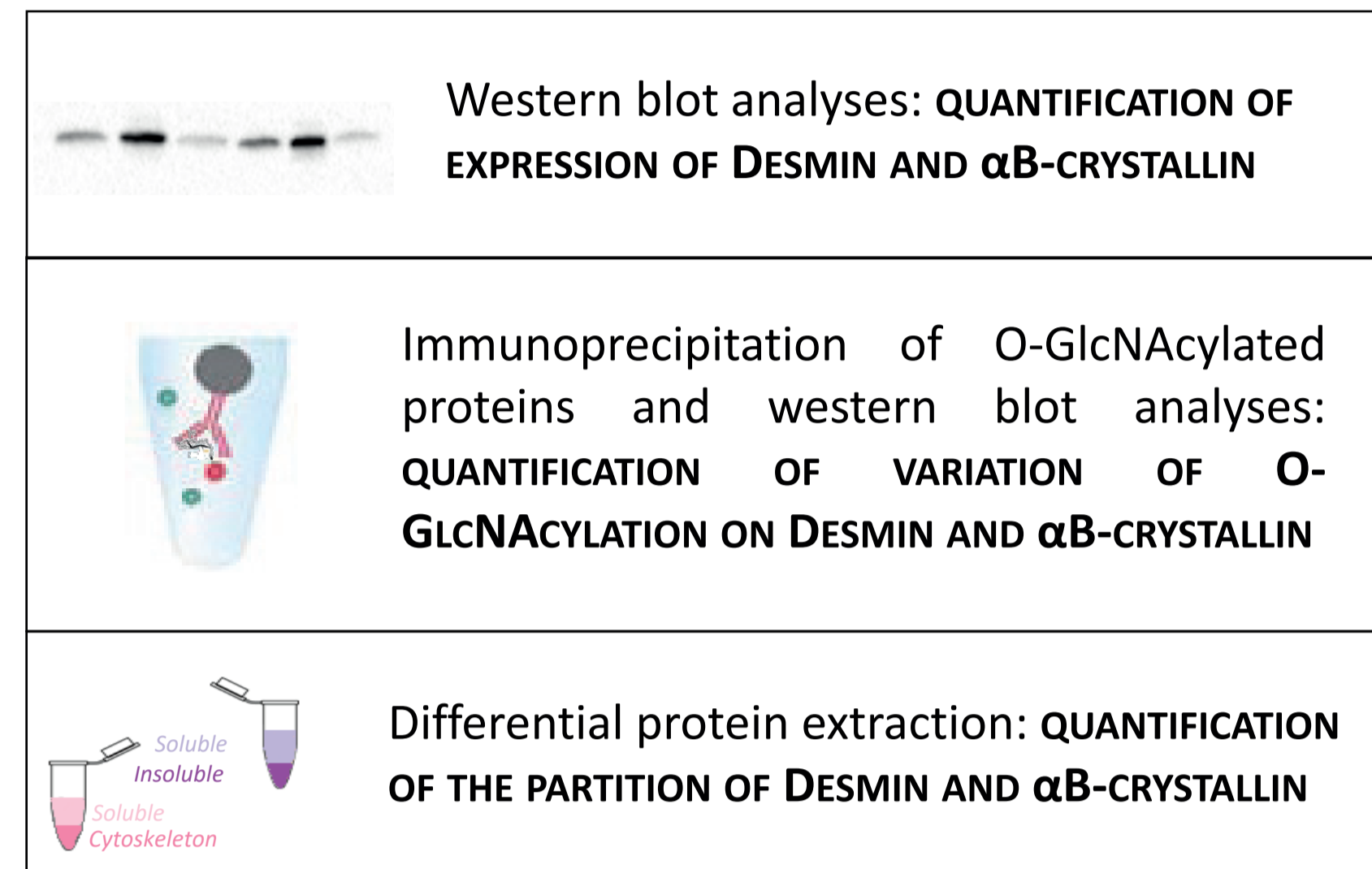


C2C12 myotubes – 5-days differentiation
All experiments were done on C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes

Increase or decrease of the global O-GlcNAcylation level by inhibitors of OGA (Thiamet G) or OGT (Ac_4 -5S-GlcNAc)



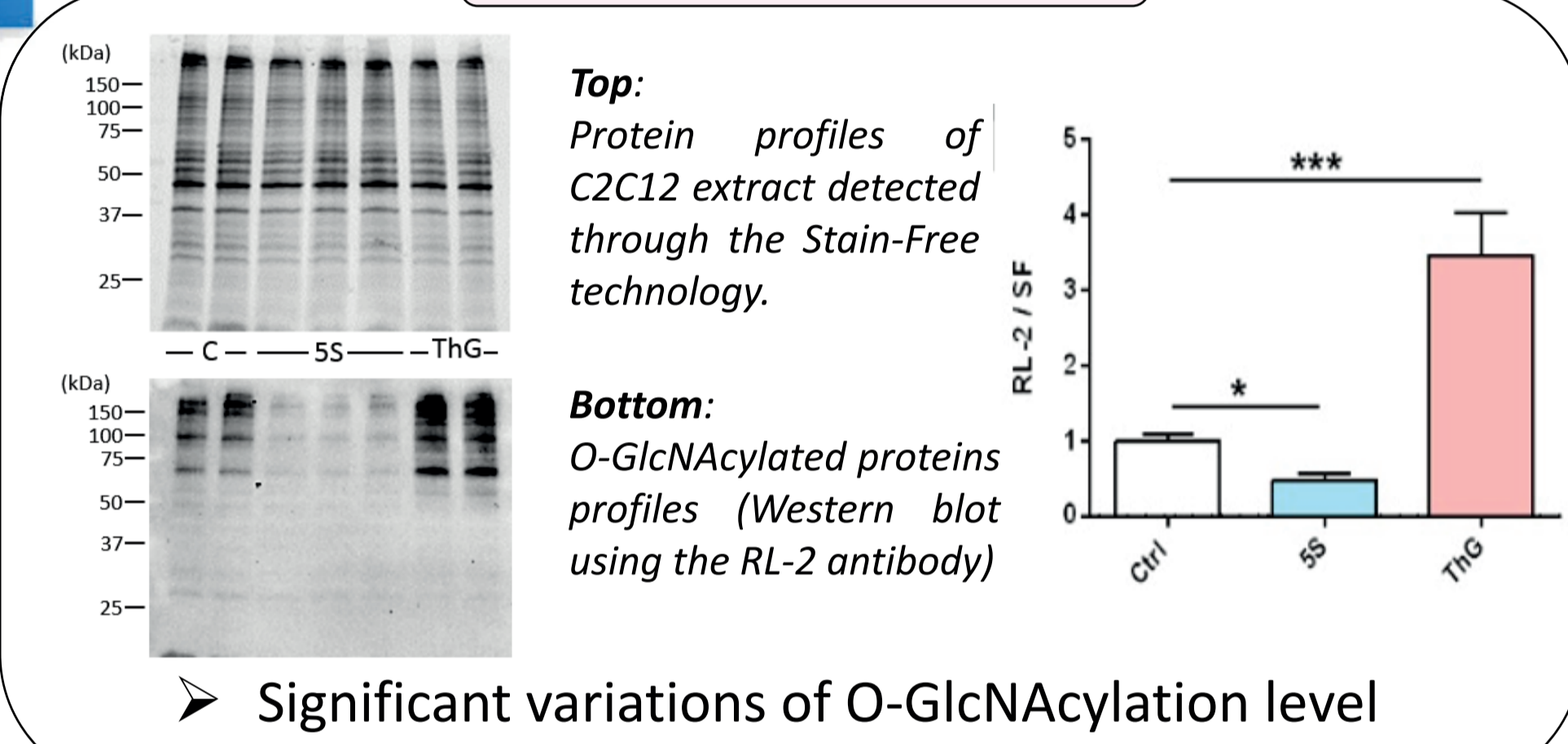
DOWNSTREAM ANALYSES



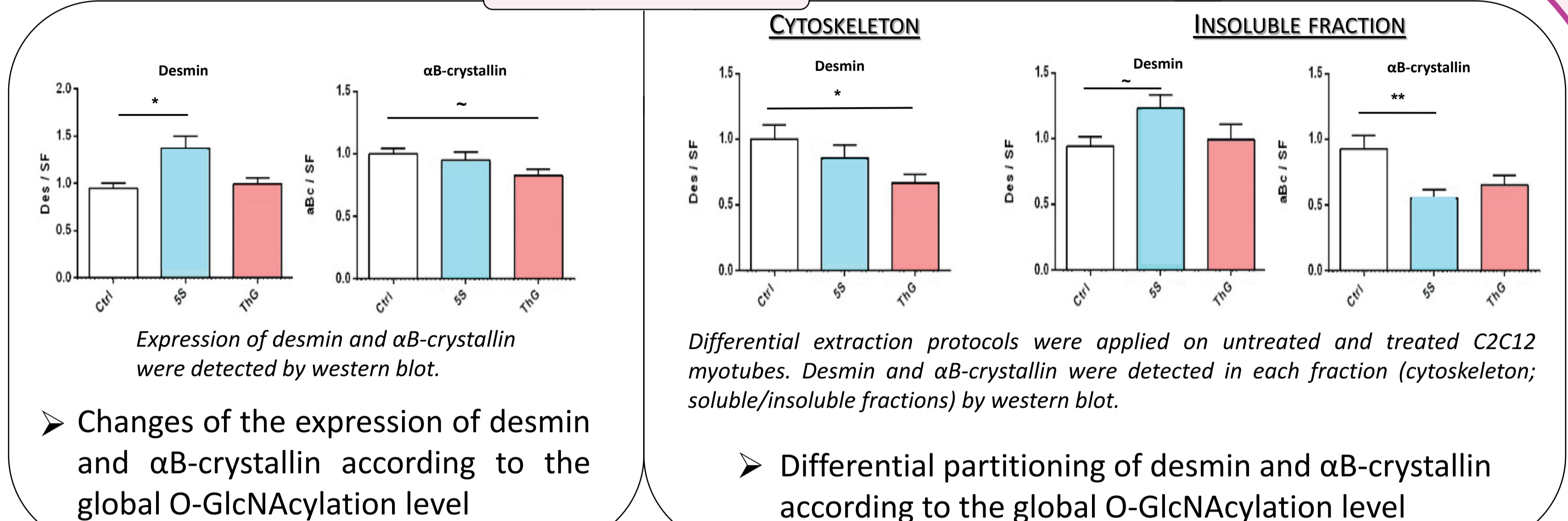
MAJOR RESULTS



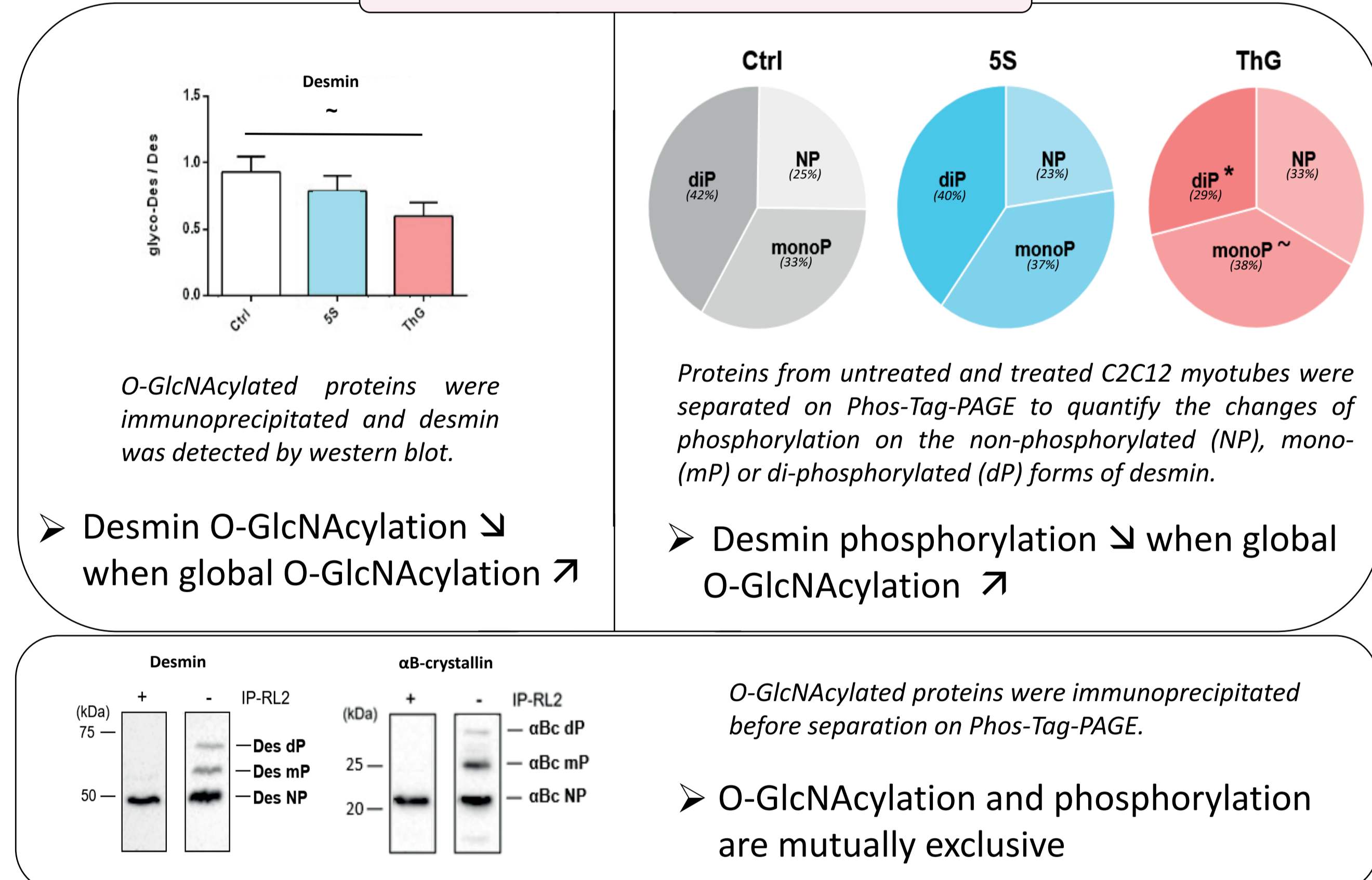
TREATMENTS VALIDATION



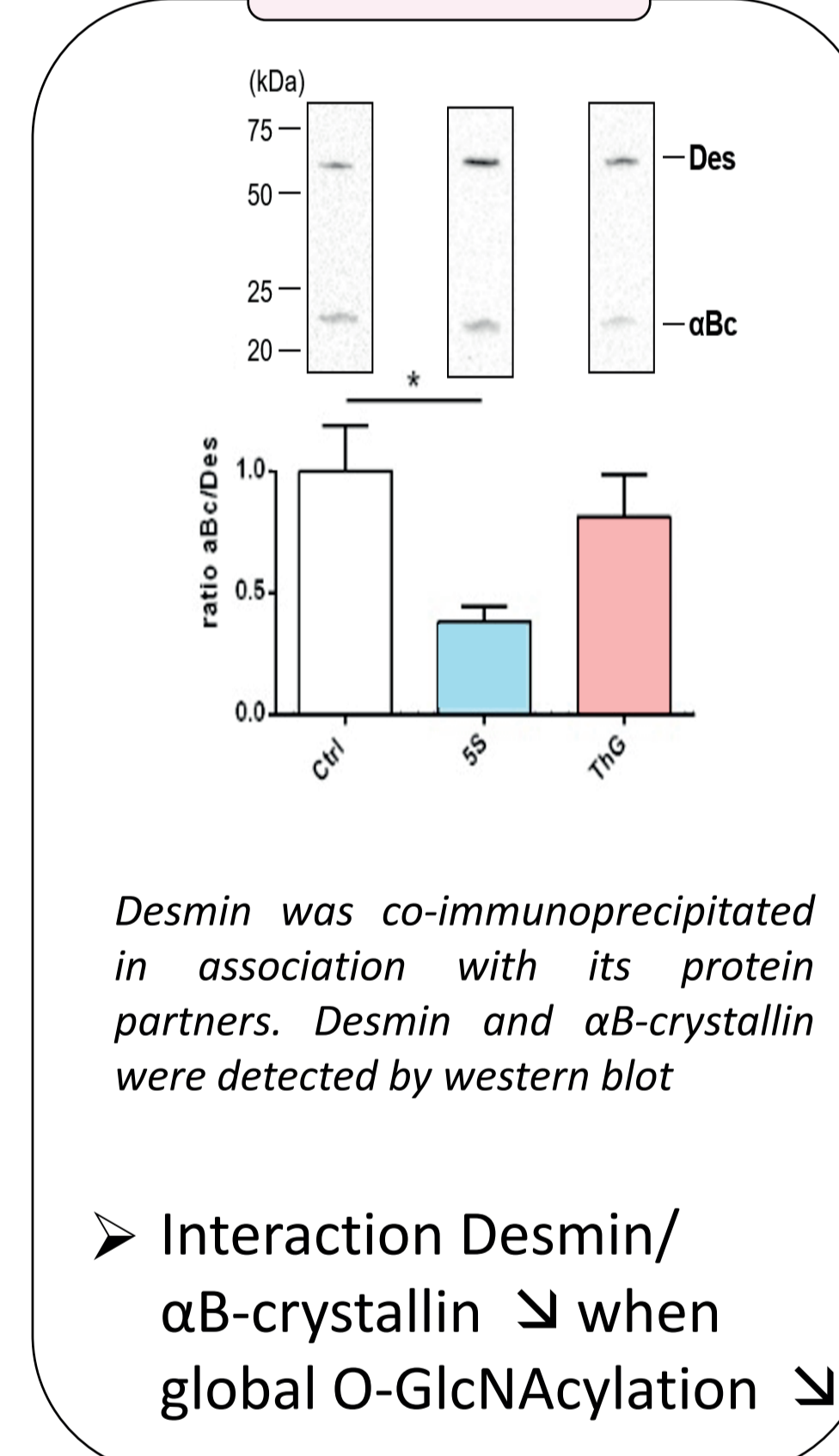
PROTEIN EXPRESSION



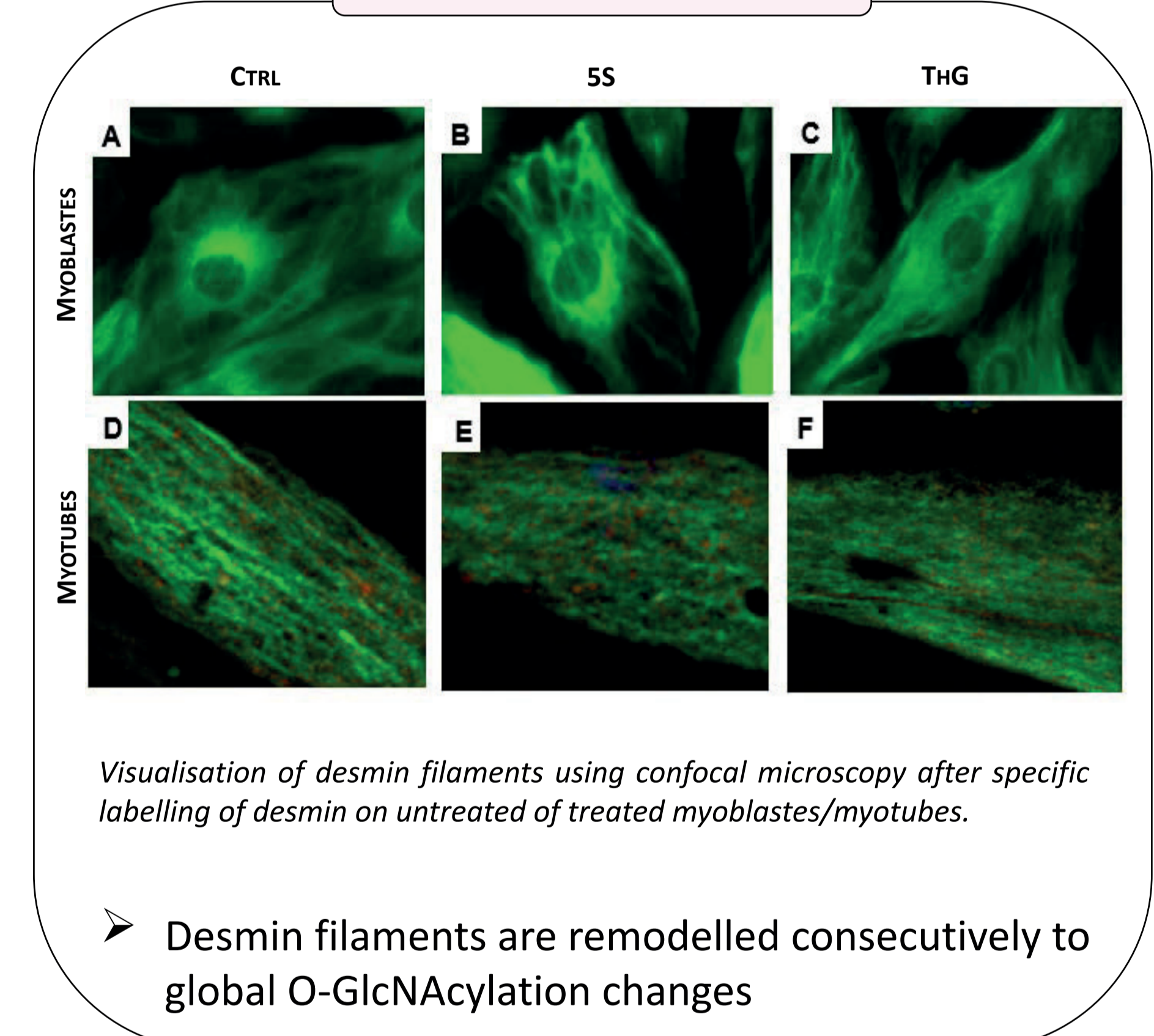
O-GLCNAcylation / PHOSPHORYLATION



INTERACTION

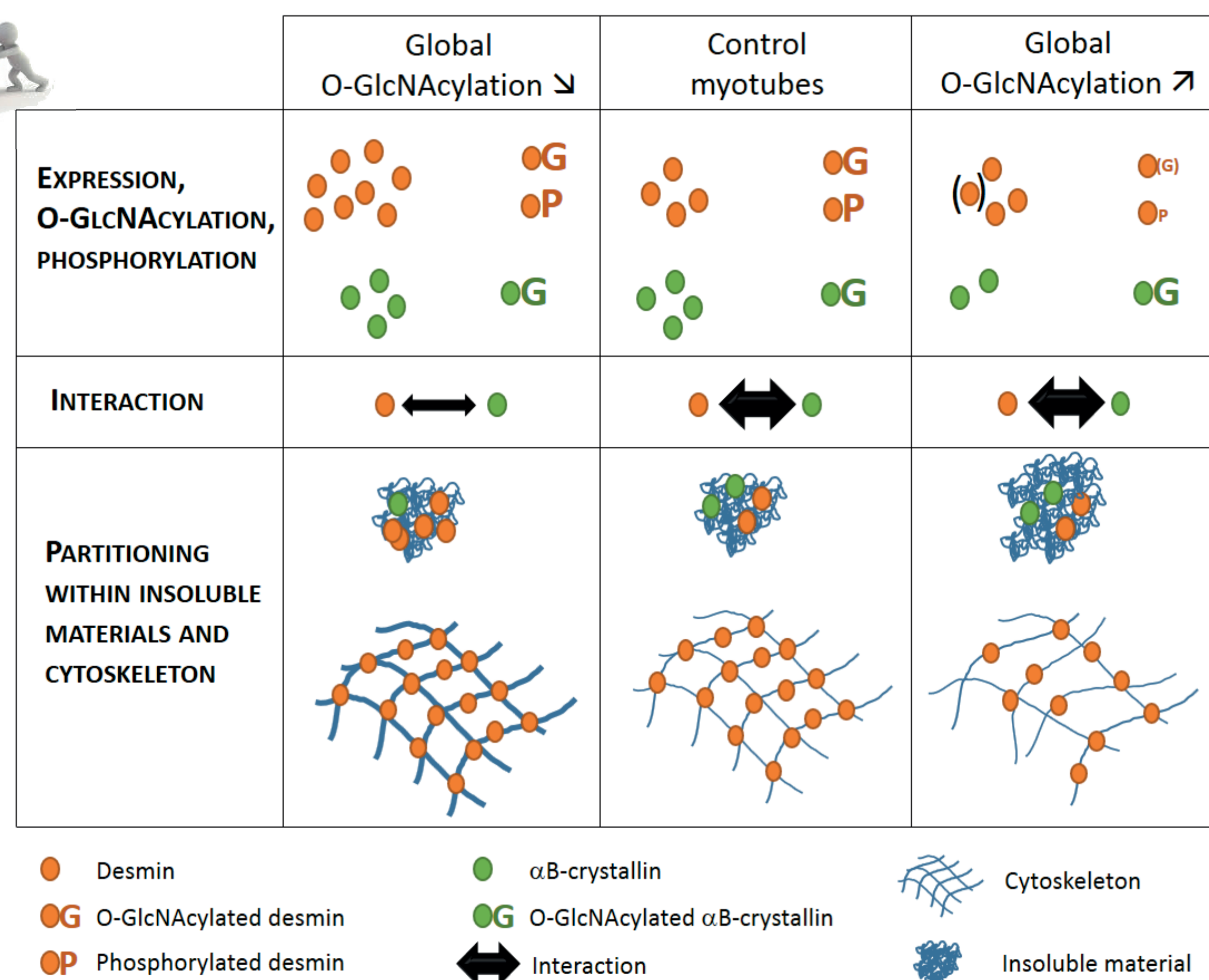


ARCHITECTURE FILAMENTS



Statistical significance \Rightarrow *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; \sim : $p < 0,1$

SUMMARY



Global O-GlcNAcylation changes on C2C12 myotubes impact :

- ✓ Expression of desmin and α B-crystallin
- ✓ Differential partitioning of desmin towards insoluble protein materials
- ✓ O-GlcNAcylation and phosphorylation levels of desmin
- ✓ Modulation of the interaction between desmin and α B-crystallin
- ✓ Remodeling of desmin filaments

O-GlcNAcylation is a key regulator of the organization and reorganization of sarcomeric cytoskeleton, in particular the intermediate filaments of desmin

ACKNOWLEDGEMENTS



This work was supported by the AFM-Téléthon (research grant 21011, project DESMINO-GlcNAc and PhD fellowship 22054)

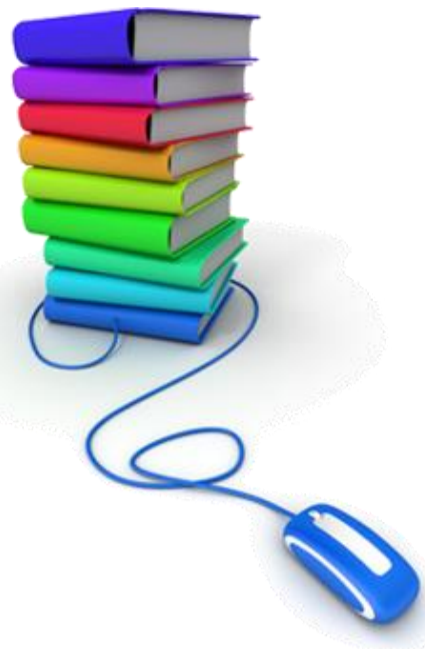
Impact of O-GlcNAcylation changes on desmin behavior in differentiated myotubes

Charlotte CLAEYSSEN, Bruno BASTIDE, Caroline CIENIEWSKI-BERNARD

URePSSS – EA7369 Physical Activity, Muscle, Health – University of Lille, France

✉ caroline.cieniewski-bernard@univ-lille.fr

BACKGROUND



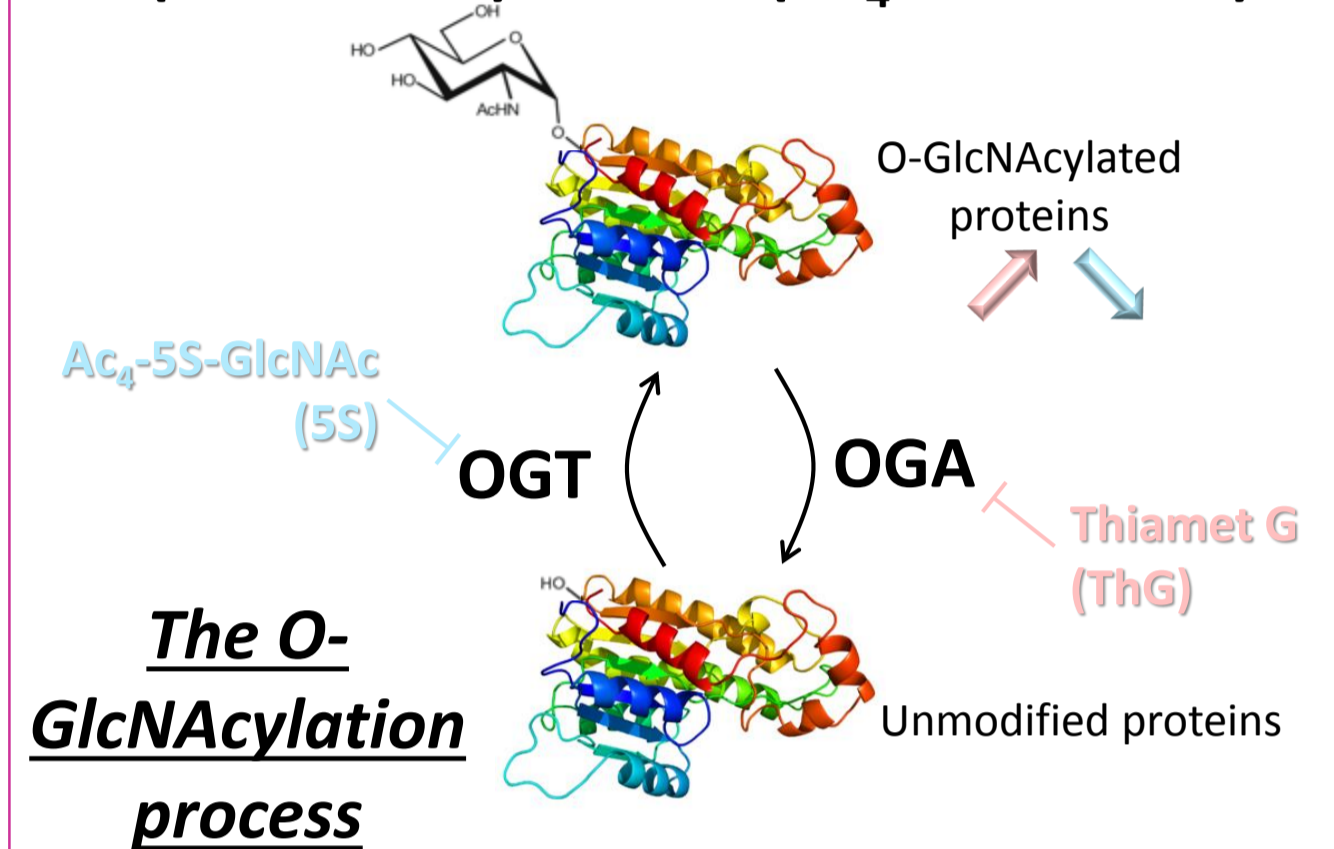
O-GlcNAcylation is an atypical glycosylation akin to phosphorylation. Dynamic and reversible, the O-GlcNAcylation modifies a plethora of myofibrillar proteins. We have previously demonstrated that O-GlcNAcylation regulated sarcomeric cytoskeleton since the sarcomere morphometry is modified consecutively to O-GlcNAcylation changes, in correlation with modification of the O-GlcNAcylation level of myofibrillar proteins. Moreover, these structural changes partly involved desmin, a key protein of intermediate filaments in striated muscle, and its molecular chaperone, the α B-crystallin. We focused herein on the effect of O-GlcNAcylation changes on the desmin behavior in differentiated myotubes, as well as its molecular chaperone, the α B-crystallin.

METHODS



All experiments were done on C2C12 skeletal muscle cells differentiated into myotubes

Increase or decrease of the global O-GlcNAcylation level by inhibitors of OGA (Thiamet G) or OGT (Ac₄-5S-GlcNAc)

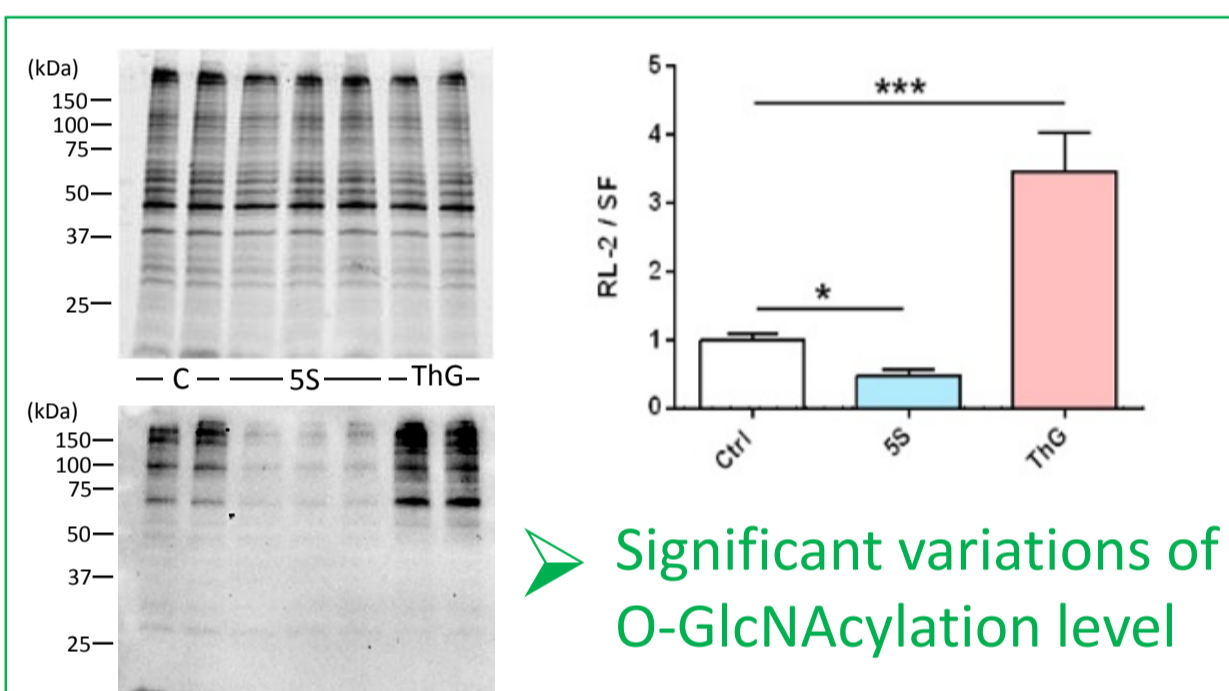


DOWNSTREAM ANALYSES

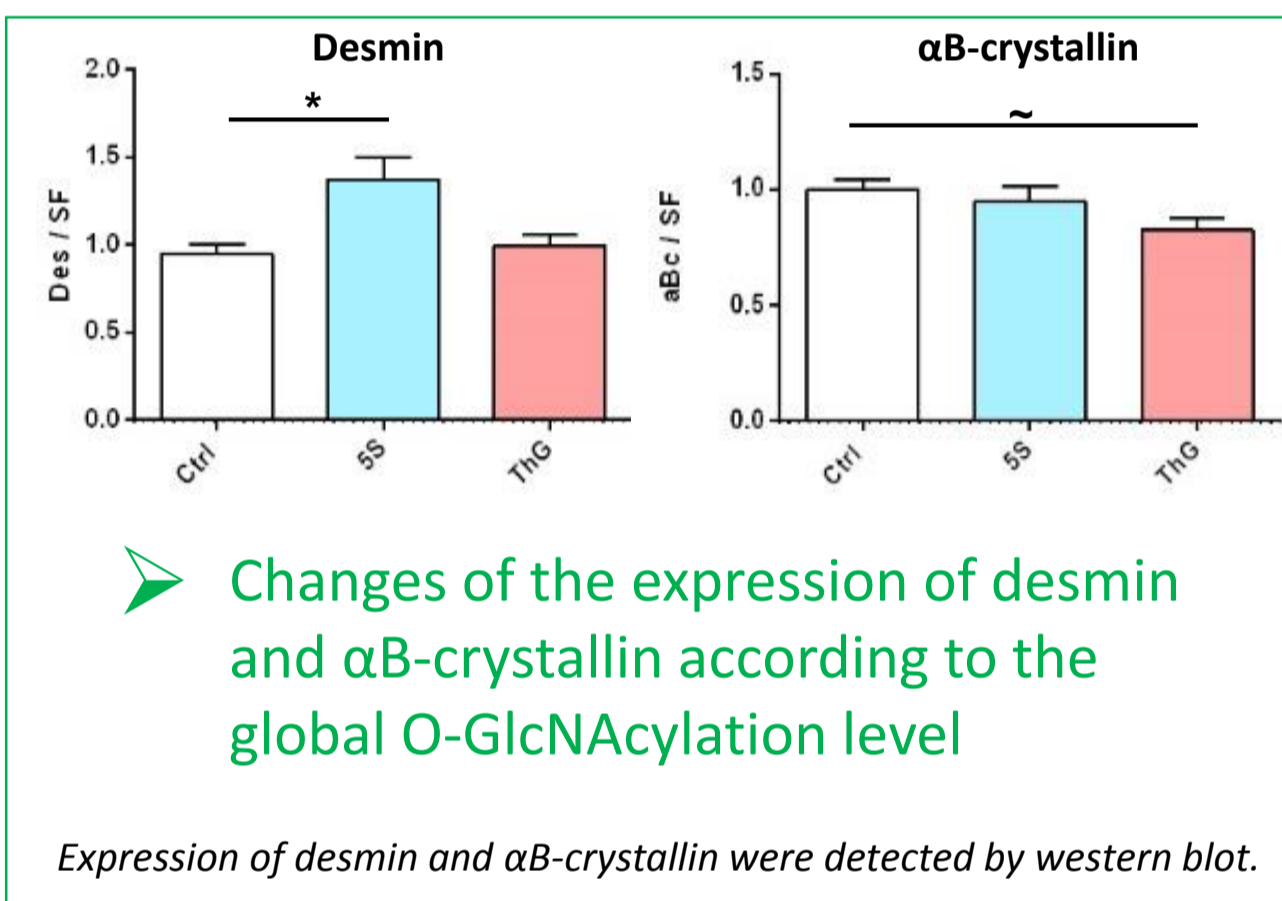
- Western blot analyses: QUANTIFICATION OF EXPRESSION OF DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Immunoprecipitation of O-GlcNAcylated proteins and western blot analyses: QUANTIFICATION OF VARIATION OF O-GlcNAcylation ON DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Differential protein extraction: QUANTIFICATION OF THE PARTITION OF DESMIN AND α B-CRYSTALLIN

- Co-immunoprecipitation of desmin and its protein partners: QUANTIFICATION OF THE INTERACTION BETWEEN DESMIN AND α B-CRYSTALLIN
- Phos-Tag electrophoresis and western blot: QUANTIFICATION OF VARIATION OF THE NON-PHOSPHORYLATED AND THE PHOSPHORYLATED DESMIN ACCORDING TO THE NUMBER OF PHOSPHATE MOIETIES
- Immunofluorescence analysis: VISUALISATION OF INTERMEDIATE FILAMENT OF DESMIN

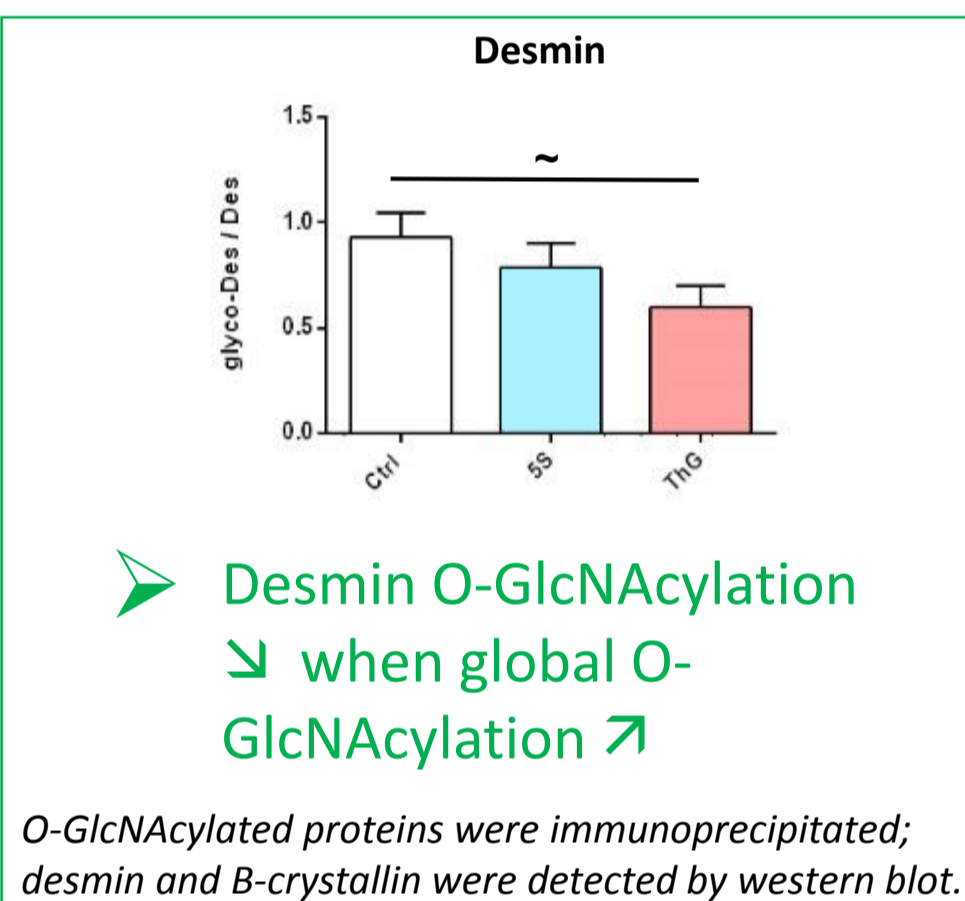
MAJOR RESULTS



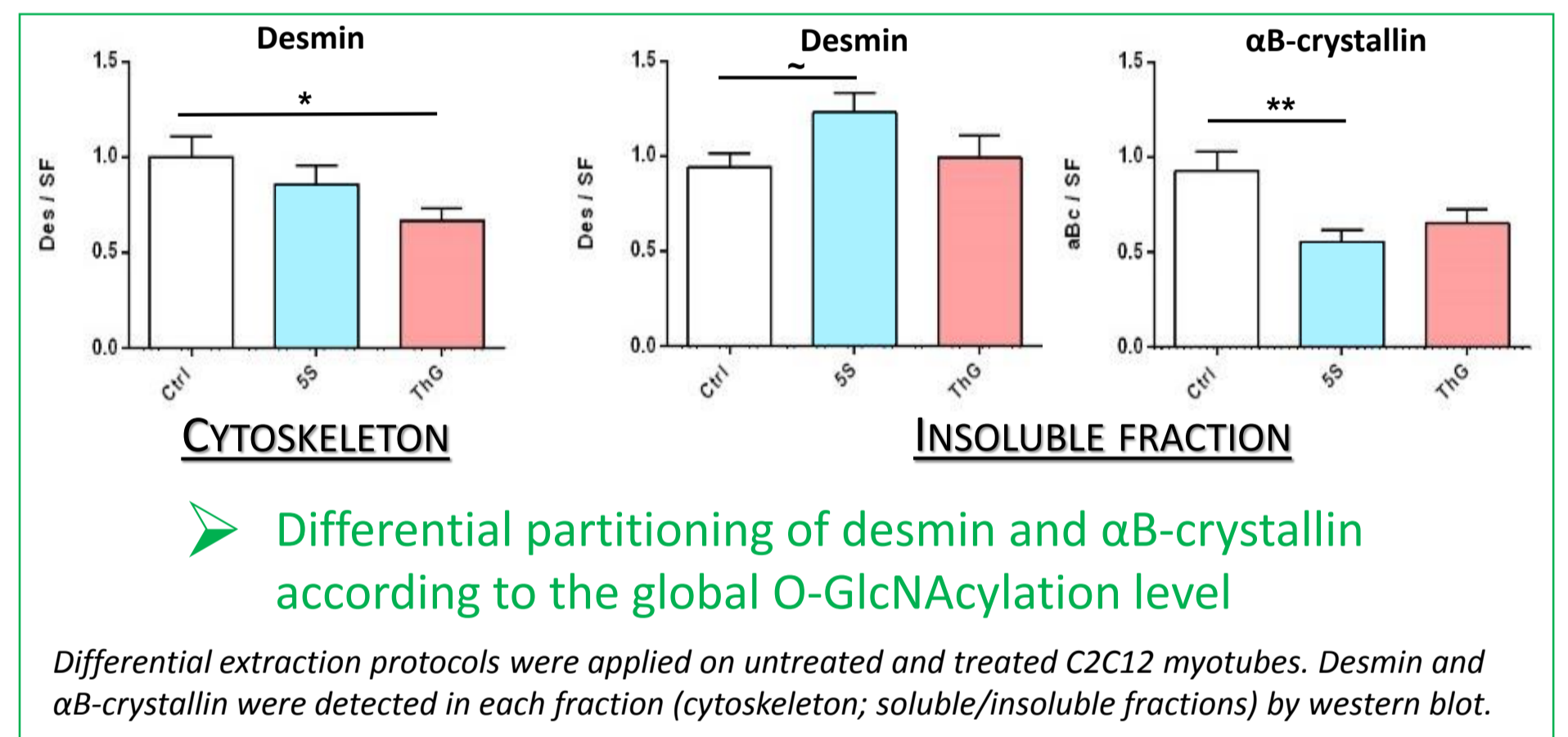
Top: Protein profiles of C2C12 extract detected through the Stain-Free technology. Bottom: O-GlcNAcylated proteins profiles (Western blot using the RL-2 antibody)



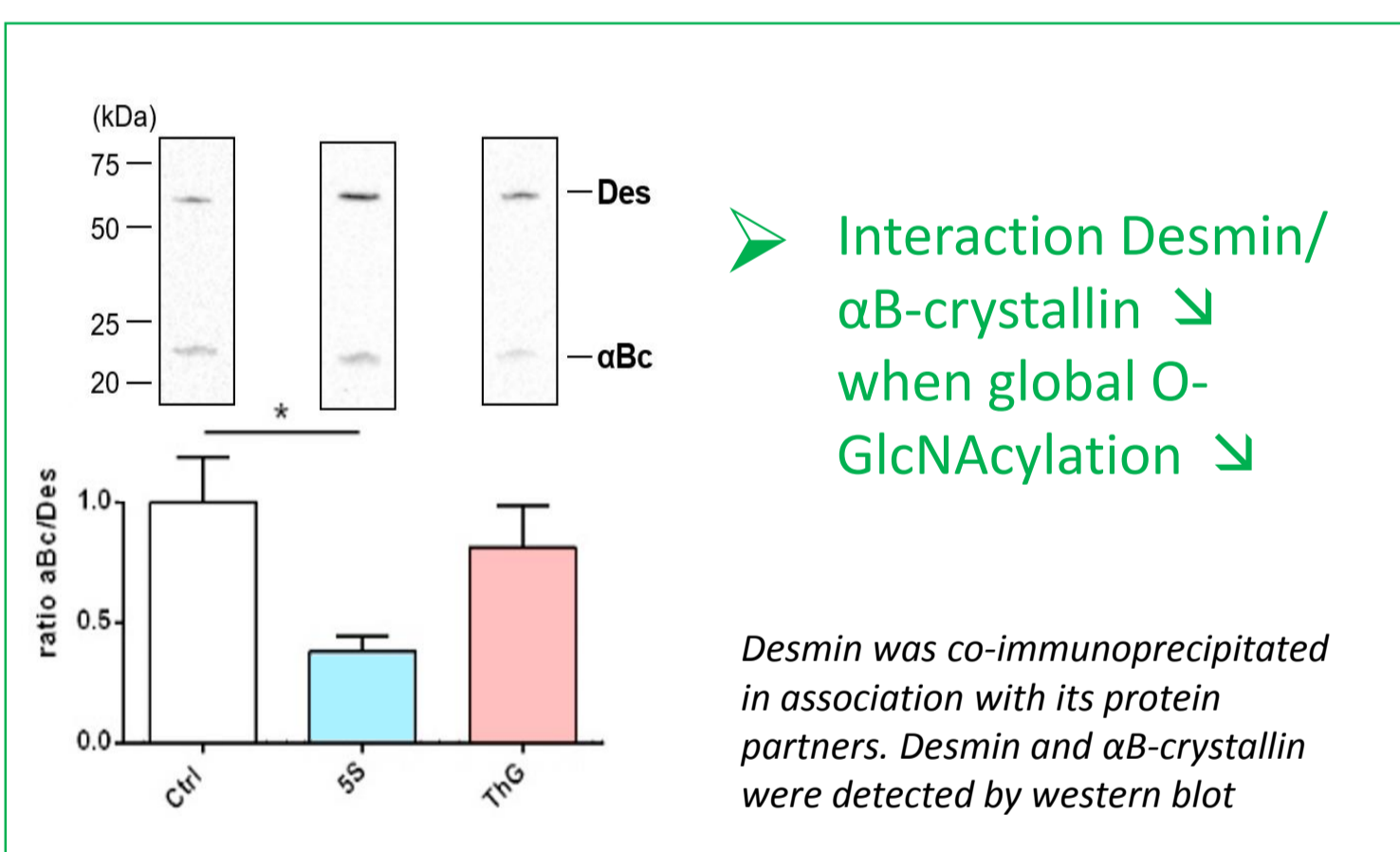
Expression of desmin and α B-crystallin were detected by western blot.



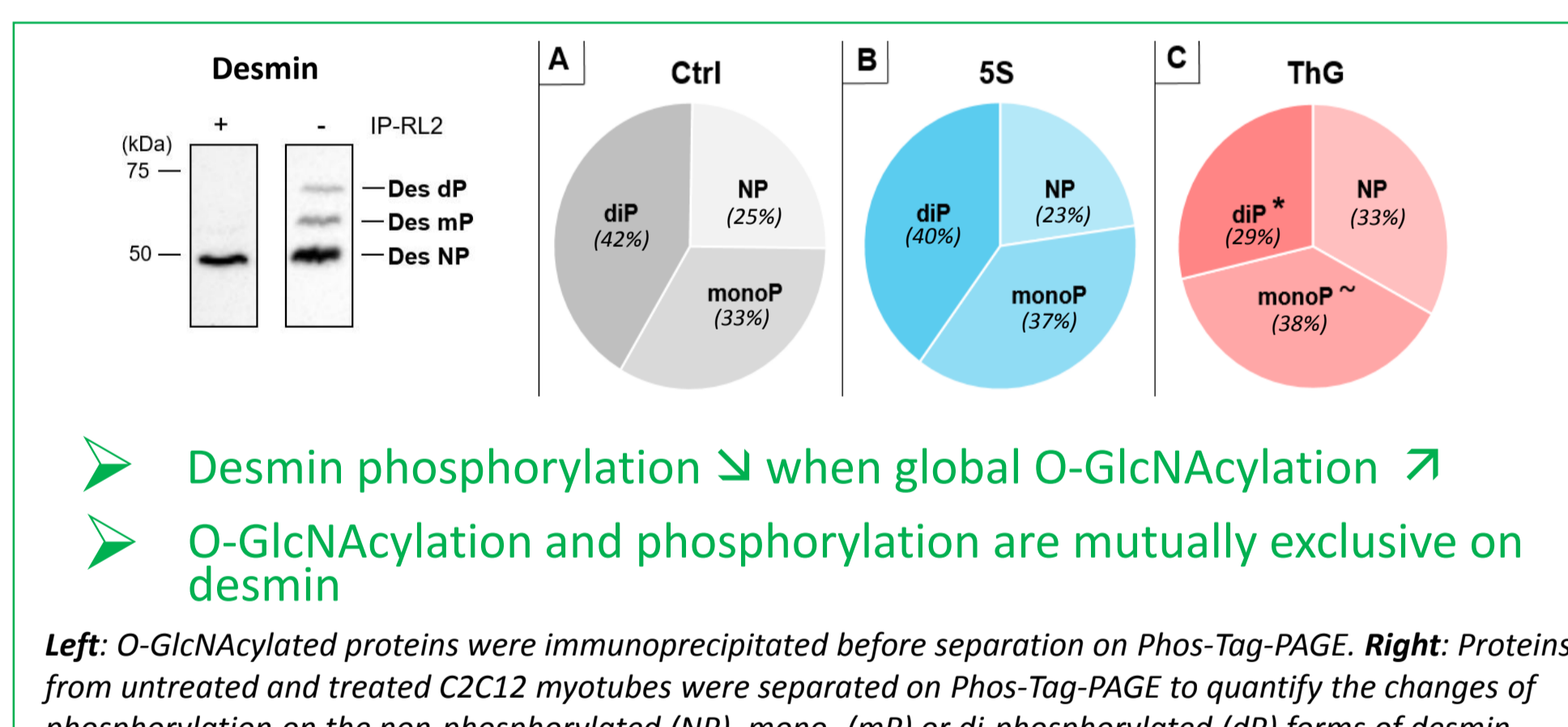
O-GlcNAcylated proteins were immunoprecipitated; desmin and B-crystallin were detected by western blot.



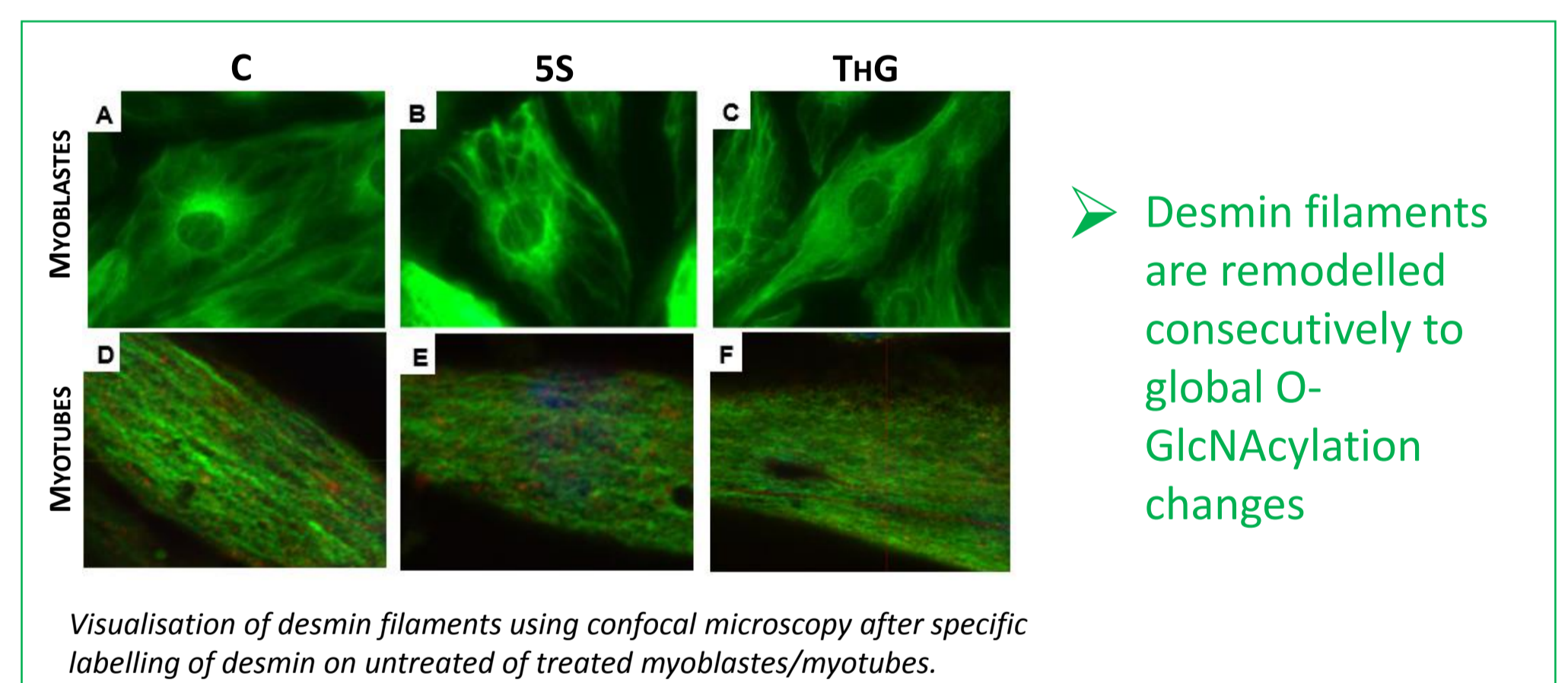
Differential extraction protocols were applied on untreated and treated C2C12 myotubes. Desmin and α B-crystallin were detected in each fraction (cytoskeleton; soluble/insoluble fractions) by western blot.



Desmin was co-immunoprecipitated in association with its protein partners. Desmin and α B-crystallin were detected by western blot



Left: O-GlcNAcylated proteins were immunoprecipitated before separation on Phos-Tag-PAGE. Right: Proteins from untreated and treated C2C12 myotubes were separated on Phos-Tag-PAGE to quantify the changes of phosphorylation on the non-phosphorylated (NP), mono- (mP) or di-phosphorylated (dP) forms of desmin.



Visualisation of desmin filaments using confocal microscopy after specific labelling of desmin on untreated of treated myoblasts/myotubes.

Statistical significance \Rightarrow *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ~ : $p < 0,1$

SUMMARY

	Global O-GlcNAcylation \downarrow	Control myotubes	Global O-GlcNAcylation \uparrow
EXPRESSION, O-GlcNAcylation, PHOSPHORYLATION	High O-GlcNAcylation (G), Low Phosphorylation (P)	Control levels	Low O-GlcNAcylation (G), High Phosphorylation (P)
INTERACTION	Weak interaction between desmin and α B-crystallin	Strong interaction	Weak interaction
PARTITIONING WITHIN INSOLUBLE MATERIALS AND CYTOSKELETON	Desmin in insoluble material, α B-crystallin in cytoskeleton	Desmin and α B-crystallin in insoluble material	Desmin in insoluble material, α B-crystallin in cytoskeleton

- Desmin
- α B-crystallin
- O-GlcNAcylated desmin
- O-GlcNAcylated α B-crystallin
- Phosphorylated desmin
- Interaction
- Cytoskeleton
- Insoluble material



Global O-GlcNAcylation changes on C2C12 myotubes impact :

- ✓ O-GlcNAcylation and phosphorylation levels of desmin
- ✓ Expression of desmin and α B-crystallin
- ✓ Modulation of the interaction between desmin and α B-crystallin
- ✓ Differential partitioning of desmin towards insoluble protein materials
- ✓ Remodeling of desmin filaments

O-GlcNAcylation is a key regulator of the organization and reorganization of sarcomeric cytoskeleton, in particular the intermediate filaments of desmin

ACKNOWLEDGEMENTS



This work was supported by the AFM-Téléthon (grant 21011, project DESMINO-GlcNAc)

