

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Mémoire présenté par

Caroline CIENIEWSKI-BERNARD

Maître de Conférences à l'Université de Lille 1

EA7369, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société
Equipe Activité Physique Muscle Santé

En vue d'obtenir l'

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

**La O-GlcNAcylation : un élément clé de
l'homéostasie protéique et de la cytoarchitecture
sarcomérique du muscle squelettique.**

Soutenue publiquement le 02 décembre 2015 devant la commission d'examen

Pr Onnik AGBULUT

Professeur Université Pierre et Marie Curie, UMR8256, Paris

Pr Isabelle FOURNIER

Professeur Université Lille 1, PRISM INSERM U1192, Lille

Dr Tarik ISSAD

DR CNRS, INSERM U1016, Institut Cochin, Paris

Pr Bruno ALLARD

Professeur Université Lyon 1, UMR5534, Lyon

Pr Tony LEFEBVRE

Professeur Université Lille 1, UMR8576, Lille

Dr Florence PINET

DR INSERM, INSERM U1167, Lille

Pr Bruno BASTIDE

Professeur Université Lille 1, UrePSSS, Lille

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Mémoire présenté par

Caroline CIENIEWSKI-BERNARD

Maître de Conférences à l'Université de Lille 1

EA7369, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société
Equipe Activité Physique Muscle Santé

En vue d'obtenir l'

HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

**La O-GlcNAcylation : un élément clé de
l'homéostasie protéique et de la cytoarchitecture
sarcomérique du muscle squelettique.**

Soutenue publiquement le 02 décembre 2015 devant la commission d'examen

Pr Onnik AGBULUT

Professeur Université Pierre et Marie Curie, UMR8256, Paris

Pr Isabelle FOURNIER

Professeur Université Lille 1, PRISM INSERM U1192, Lille

Dr Tarik ISSAD

DR CNRS, INSERM U1016, Institut Cochin, Paris

Pr Bruno ALLARD

Professeur Université Lyon 1, UMR5534, Lyon

Pr Tony LEFEBVRE

Professeur Université Lille 1, UMR8576, Lille

Dr Florence PINET

DR INSERM, INSERM U1167, Lille

Pr Bruno BASTIDE

Professeur Université Lille 1, UrePSSS, Lille

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur

A Denis

A Clément

« La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance. »

Claude Bernard

Remerciements

Je remercie chaleureusement et sincèrement toutes les personnes qui m'ont accompagnée, aidée, soutenue, supportée parfois, tout au long de ma carrière, et qui ont contribué à la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire.

*Je tiens tout d'abord à remercier **Mr le Pr Bruno Bastide**, qui a dirigé ce travail. Bruno, je te remercie pour ton encadrement depuis le DEA puis la thèse, et notamment pour le soutien que tu m'as accordé à la fin de ma première année de thèse, qui était assez... compliquée. Je n'en serai pas là aujourd'hui... Tu as su m'encourager tout au long des différentes étapes qui ont marqué ma carrière. Je te remercie aujourd'hui d'avoir su me laisser toute l'autonomie et la liberté nécessaires pour que je puisse pleinement développer mes projets de recherche et encadrer nos étudiants ; je pense que ce n'est pas forcément une décision facile à prendre en tant que directeur ou encadrant. Merci pour ta confiance et pour ton soutien dans les différents choix que j'ai dû effectuer, que ce soit dans l'orientation des projets, dans le choix des collaborations... Reçois mes plus fervents remerciements.*

***Mme le Pr Isabelle Fournier, Mr le Pr Onnik Agbulut, et Mr le Dr Tarik Issad.** Je vous remercie d'avoir accepté si rapidement d'être rapporteurs de cette HDR, malgré vos emplois du temps chargés. C'est un très grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres de ce jury. **Mr Tarik Issad**, de par votre expertise dans le domaine de la O-GlcNAcylation, il était très important pour moi de pouvoir vous compter parmi les membres de cette commission d'examen. Je remercie **Onnik**, pour son accueil chaleureux lors de notre venue à Paris, et pour ses nombreux conseils quant aux modèles de desminopathies, ce qui me permettra d'avancer sur un projet de recherche qui me tient à cœur depuis quelques années déjà. Un grand merci aussi à **Isabelle**, non seulement pour l'évaluation de ces travaux, et aussi pour m'avoir initiée à l'imagerie MALDI, ce qui m'a ouvert de nouvelles perspectives de travail.*

***Mme le Dr Florence Pinet, Mr le Pr Tony Lefebvre et Mr le Pr Bruno Allard**, je vous remercie de faire partie de ce jury pour examiner mes travaux de recherche. **Bruno**, je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de juger ce travail à l'interface physiologie, glycobiologie, et protéomique. **Tony**, je te remercie pour m'avoir accueillie au C9 lors de mon stage de maîtrise, de m'avoir si bien initiée à la O-GlcNAcylation et aux différentes techniques de biochimie. Ta curiosité et ton enthousiasme m'avaient à l'époque confortée dans l'idée de poursuivre mon cursus par le DEA, et la thèse. Nous voilà à l'HDR aujourd'hui. **Florence**, je te remercie sincèrement pour tout ce que tu m'as appris lors de mon stage post-doctoral, en particulier la réflexion scientifique, l'organisation, la gestion des*

projets, l'encadrement, et la liste est longue... J'essaie chaque jour de mettre en pratique tout ce que tu m'as enseigné. Trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

*Je remercie également **Mr le Pr Serge Berthoin**, notre directeur d'unité, qui s'évertue depuis quelques années à nous offrir de bonnes conditions de travail, malgré sa charge de directeur de l'URePSSS, de l'EA... Merci pour la confiance et la liberté que tu nous accordes dans la gestion de nos travaux, ainsi que pour tes grandes qualités humaines.*

*Pour ce qui est de me supporter au quotidien, je remercie tout particulièrement **Erwan**. Merci pour ton écoute, ta compréhension, et ton aide dans des manip de « bioch » qui sont assez loin de ton domaine de prédilection. Je sais (faute avouée est à moitié pardonnée) que je ne suis pas facile quand ça ne marche pas (ce qui n'arrive pas souvent !), ou qu'il est difficile de me suivre quand les idées bouillonnent, mais tu es toujours là, et c'est une grande chance de pouvoir compter sur toi...*

*Il est des rencontres qu'on ne peut pas oublier. Je pense à **Barbara**, que j'ai eu l'énorme chance d'accueillir au laboratoire pour son stage post-doctoral. Un grand merci pour tout le travail que tu as fait (et bien fait !), pour ton dynamisme, pour ton rire (et oui, qui l'eut crût ?), pour toute l'aide précieuse que tu m'as apportée... Je te souhaite de pouvoir intégrer un laboratoire pour que tu puisses t'épanouir dans la recherche (sans oublier bien sûr ta vie personnelle). J'avoue que j'envie le labo qui aura la chance de te recruter...*

*Un grand merci aussi aux étudiants qui ont ou qui travaillent encore avec moi, en particulier **Matthias, Amandine, et Samir**... Je suis contente de la dynamique et de l'enthousiasme qui existent entre vous et grâce à vous dans notre petit groupe, et de toute l'aide que vous vous apportez mutuellement dans cette complicité qui vous anime. **Matthias**, te voilà dans la dernière ligne droite... Depuis cinq ans (déjà !), j'apprécie ton sérieux et ton investissement dans le projet « structure ». Je te souhaite de trouver un post-doc qui te permettra d'envisager la suite de ta carrière sous les meilleurs auspices possibles. Tu le mérites vraiment, quand on connaît ton combat de tous les jours. **Amandine et Samir**, j'espère que vous pourrez vous épanouir, scientifiquement et personnellement, au laboratoire. Merci aussi aux autres étudiants que j'ai formé au laboratoire, en particulier **Magdalène, Paul, François-Xavier, Floriane**, qui ont pleinement participé aux projets présentés dans ce mémoire, notamment pour les longues mises au point méthodologiques.*

*Un merci tout particulier à **Catherine**. Tu as eu Calliope, et moi, je t'ai eu toi pour me pousser et m'encourager depuis un petit moment à soutenir cette HDR. Merci aussi pour tous tes conseils de « pure » glycobio, et pour l'amitié qui nous unit depuis le DEA (et oui, ça commence à dater !). Que de bons moments partagés depuis avec nos garçons réunis !*

*Je remercie aussi l'ensemble des membres du laboratoire : **Marie-Hélène**, pour son écoute ; **Valérie**, pour son aide pour les fibres pelées (et c'est pas fini !), **Laetitia** et les autres membres du laboratoire, sans oublier bien sûr nos collègues de Lille 2. Un merci tout particulier à **Emilie et Delphine**, qui nous ont souvent sauvés de mauvais pas administratifs (et non des moindres !).*

Je remercie aussi tous ceux qui, par le biais de collaborations, d'aide, de conseils... ont contribué à l'avancée de ces travaux. Merci aussi à ceux qui ont bien voulu prendre du temps pour relire ce mémoire...

*Je remercie du fond du cœur **mes parents**, qui m'ont toujours aidée, soutenue et encouragée. Avoir pu compter sur vous m'a permis (et me permet encore) d'avancer, aussi bien dans ma vie personnelle que dans ma vie professionnelle.*

*Je trouve difficilement mes mots pour remercier **Denis**, mon mari, pour tout son amour et son soutien inconditionnel depuis ma première année à la fac, pour sa patience, et ses encouragements dans les périodes difficiles. Merci tout simplement d'être là à mes côtés. Enfin, je remercie mon p'tit boy (enfin mon grand maintenant !) pour sa compréhension (enfin, relative quand même, n'est-ce-pas **Clément** ?) face au temps qu'il a toujours dû partager entre mon rôle de maman et les heures de travail à la maison ou mes nombreux retards à cause d'une dernière manip à finir, et ce depuis ma thèse jusqu'à la rédaction de cette HDR... Tu es ma plus belle réussite, ma fierté, mon moteur au quotidien...*

A tous, merci...

Abréviations

Ac4-GlcNAz :	peracétyl-azido-glucosamine
AHA :	L-azido-homoalanine
2-DE ou 2D-PAGE :	two-dimensional gel electrophoresis
2D-DIGE :	Differential Gel Electrophoresis
DON :	6-diazo-5-oxo-norleucine
EDL :	extensor digitorum longus
GalNAc :	N-acétyl-D-galactosamine
GalNAz :	N-azido-acétylgalactosamine
GalT :	galactosyl transférase
GlcNAc :	N-acétyl-D-glucosamine
GlcNAz :	N-azido-glucosamine
HBP :	Hexosamine Biosynthesis pathway
HH :	hypodynamie-hypokinésie
HU :	Hindlimb Unloading
IEF :	isoélectrofocalisation
LC-MS :	liquid Chromatography – Mass Spectrometry
MALDI-TOF :	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation – Time-of-Flight
MHC :	Myosin Heavy Chain
MLC :	Myosin Light Chain
MS/MS ou MS2 :	tandem mass spectrometry
OGA :	O-GlcNAcase ou N-acétyl- β -D-glucosaminidase
O-GlcNAcylation :	O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation
OGT :	O-GlcNAc transférase (uridine diphospho-N-acétylglucosamine polypeptide β -N-acétylglucosaminyltransférase)
PUGNAc :	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenyl carbanate
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate – polyacrylamide Gel Electrophoresis
sHSP :	small Heat Shock Protein
SILAC :	Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell Culture
SILAM :	Stable Isotope Labelling of Amino acids in Mammals
sWGA :	succinyl Wheat Germ Agglutinin
Thiamet G :	thiazoline amino-ethyl gluco-configured
Tn :	troponine
TPR :	tetratricopeptide repeat
WGA :	Wheat Germ Agglutinin

Table des matières

Préambule	1
Curriculum vitae	2

- INTRODUCTION -

Première partie : le muscle squelettique	15
---	-----------

1. Du muscle squelettique aux fibres musculaires.	15
1.1. Organisation macroscopique.	15
1.2. Organisation microscopique : les sarcomères.....	16
2. Protéines impliquées dans les propriétés contractiles du muscle squelettique et mécanisme de la contraction musculaire.....	18
2.1. Protéines constitutives du filament épais de myosine.	18
2.2. Protéines constitutives du filament fin.	19
2.3. Génération de force et mouvement.....	21
2.4. Le couplage excitation-contraction.....	24
3. La cytoarchitecture sarcomérique.	25
3.1. Autres protéines constitutives du sarcomère.	26
3.2. Les filaments intermédiaires.....	29
3.3. Interactome structural et sa régulation.....	30
4. Polymorphisme des fibres musculaires et plasticité musculaire.	32
4.1. Hétérogénéité du tissu musculaire : les différents types de fibres.....	32
4.2. Expression des protéines myofibrillaires selon le type de fibre.	33
4.3. Transition entre les différents types de fibres musculaires : la plasticité musculaire.....	34

Seconde partie : la O-N-acétyl-β-D-glucosaminylation	36
--	-----------

1. La O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique.....	36
1.1. Mécanisme général du processus de O-GlcNAcylation.	36
1.2. L'UDP-GlcNAc, donneur pour le résidu GlcNAc.	38
1.3. Les enzymes du cycle O-GlcNAcylation/dé-O-GlcNAcylation.....	39
1.4. Modulation du taux de O-GlcNAcylation.	42
2. O-GlcNAcylation et phosphorylation : une interaction complexe entre ces deux modifications post-traductionnelles.	43
3. Fonctions biologiques exercées par la O-GlcNAcylation : quelques exemples.	45

3.1. Senseur nutritionnel.....	46
3.2. Réponse cellulaire au stress.....	46
3.3. Transcription et traduction.....	47
3.4. Trafic des protéines et des organelles.....	47
3.5. Turn-over protéique.....	48
3.6. Régulation de la signalisation intracellulaire.....	48
4. L'impact de la O-GlcNAcylation sur l'homéostasie et le développement de pathologies.....	48
4.1. Diabète de type II.....	49
4.2. Maladies neurodégénératives.....	50
4.3. Maladies cardiovasculaires.....	50
4.4. Cancer.....	50

- TRAVAUX PERSONNELS -

Travaux personnels.....	51
--------------------------------	-----------

CHAPITRE I : O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques.....	52
--	-----------

1. Revue de littérature : la protéomique.....	52
1.1. Quel est l'intérêt de l'analyse protéomique ?.....	52
1.2. Différentes stratégies pour l'analyse protéomique : « Bottom-up », « Top-down », ou « Middle-down » ?.....	53
1.3. Principales stratégies de protéomique quantitative.....	55
2. Cartographie du O-GlcNAcome dans le muscle squelettique.....	68
3. Analyse protéomique différentielle dans le myocarde : vers la caractérisation de marqueurs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus.....	70
3.1. Revue de littérature : le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus.....	70
3.2. Identification de marqueurs du remodelage ventriculaire dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque : analyse par 2D-PAGE.....	71
4. Développement méthodologique : 2D-PAGE multiplex pour l'analyse du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome total.....	73
4.1. Revue de littérature : les différentes méthodes pour l'étude et la détection du O-GlcNAcome.....	74
4.2. Détection du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome global à partir d'un seul et même gel.....	80
5. Identification des sites de O-GlcNAcylation.....	84
5.1. Revue de littérature : problématique de l'identification des sites de O-GlcNAcylation.....	84

5.2. Stratégie expérimentale.	87
5.3. Identification des protéines O-GlcNAcylées après fractionnement : bilan.	91
6. Discussion générale et perspectives.	93

CHAPITRE II : O-GlcNAcylation, modulation de la contraction musculaire & MLC2 95

1. Problématique.	95
2. O-GlcNAcylation et propriétés d'activation calciques 96	96
2.1. Mesure des propriétés d'activation calcique et relation tension/pCa.	96
2.2. Effet de la N-acétyl-D-glucosamine libre sur les propriétés d'activation calciques de fibres de soléaire.	97
2.3. Effets d'une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur les propriétés d'activation calcique du soléaire.	99
3. O-GlcNAcylation et protéines contractiles : focus sur la sMLC2.	101
3.1. Revue de littérature : la MLC2 et sa modification par la phosphorylation. ...	101
3.2. Localisation de sites modifiés par la O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2.	105
3.3. Variation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la sMLC2 au cours de l'atrophie fonctionnelle.....	107
4. Discussion & perspectives.	112
4.1. O-GlcNAcylation et sensibilité calcique.	112
4.2. O-GlcNAcylation, sensibilité calcique et hypodynamie-hypokinésie.....	113
4.3. Perspectives.	114

CHAPITRE III : O-GlcNAcylation & homéostasie protéique 116

1. La O-GlcNAcylation peut-elle être impliquée dans le développement de l'atrophie musculaire ?	116
1.1. Variation du taux global de O-GlcNAcylation et de phosphorylation.....	117
1.2. Variations d'expression et d'activités enzymatiques des enzymes de la O-GlcNAcylation.	118
1.3. La O-GlcNAcylation protectrice vis-à-vis de l'atrophie fonctionnelle ?.....	119
2. O-GlcNAcylation & voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le développement de l'atrophie.	121
2.1. Revue de littérature.	121
2.2. Objectifs du projet MYOSIGNAL.	125
2.3. Effet de l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur la synthèse protéique.....	126
3. Développement d'une méthodologie de mesure d'activités kinases et OGT par spectrométrie de masse.	130

3.1. Revue de littérature : analyse de l'état d'activation des voies de signalisation intracellulaires.	131
3.2. Choix méthodologique : mesure d'activité kinase par spectrométrie de masse.	132
3.3. Mesure de l'activité de Akt par spectrométrie de masse.....	133
3.4. Mesure de l'activité de l'OGT par spectrométrie de masse.	135
4. Discussion & perspectives.	136
4.1. O-GlcNAcylation et atrophie fonctionnelle.	136
4.2. Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'homéostasie protéique.....	137

CHAPITRE IV : O-GlcNAcylation & structuration sarcomérique..... 140

1. Revue de littérature : quels sont les arguments supportant le rôle de la O-GlcNAcylation dans l'organisation sarcomérique ?	140
1.1. Cytoarchitecture cellulaire et interactions protéine-protéine.	140
1.2. Interactions protéine-protéine et modifications post-traductionnelles.	141
1.3. O-GlcNAcylation et protéines structurales.	143
2. Stratégie expérimentale.....	145
3. Variations de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires et leurs effets sur la morphométrie du sarcomère.....	146
3.1. Effet des traitements sur les myotubes C2C12 matures : la fraction myofilamentaire, plus sensible à la variation de O-GlcNAcylation.....	146
3.2. Répercussion de la variation du taux de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires sur la morphométrie sarcomérique.....	147
4. Des complexes multiprotéiques sont-ils modulés suite à la variation du taux de O-GlcNAcylation ?.....	149
4.1. Méthodologie choisie pour l'étude des complexes protéiques : la RN-PAGE.	149
4.2. Modulation des complexes multiprotéiques dans les myotubes C2C12 lors de la variation du taux de O-GlcNAcylation.....	150
5. Discussion générale et perspectives.	152
5.1. Protéines structurales constitutives des complexes protéiques modulés suite à la variation du taux de O-GlcNAcylation.....	152
5.2. Perspectives.....	154

- PROJET DE RECHERCHE -

Projet de recherche 156

1. Thème 1 : O-GlcNAcylation, protéines structurales & interactome.....	157
1.1. Focus sur la cytoarchitecture sarcomérique.	157

1.2. Analyse protéomique différentielle de l'interactome-dépendant de la desmine	163
2. Thème 2 - O-GlcNAcylation & myopathies myofibrillaires : focus sur les desminopathies	172
2.1. Existe-t-il un lien entre la O-GlcNAcylation et la physiopathologie des myopathies myofibrillaires ?.....	172
2.2. Caractérisation de l'effet d'une modulation du taux de O-GlcNAcylation dans un modèle murin de desminopathies : focus sur les mutations S13F, E413K et S460L	174
3. Thème 3 : O-GlcNAcylation, homéostasie protéique et protéines myofilamentaires.	180
4. Perspectives à long terme.....	182

- BIBLIOGRAPHIE -

Références bibliographiques	182
--	------------

- ANNEXES -

Index des figures	222
Index des tableaux	226

Préambule

Issue d'un parcours de biochimie, mes domaines de prédilection se sont rapidement tournés vers l'étude des protéines d'une part, et la glycobiologie d'autre part. Il a donc été pour moi évident d'associer ces deux domaines lors de la recherche de mon stage de DEA, et c'est tout naturellement que je me suis dirigée vers l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF, UMR-CNRS 8576, Université de Lille 1). Le sujet qui m'avait alors été confié me passionne depuis lors. Il s'agissait de travailler sur une « petite » glycosylation, atypique, relativement simple (mais finalement ô combien bien plus complexe qu'il n'y paraît !), et il m'avait alors été proposé de mettre en évidence puis de caractériser le rôle de cette glycosylation dans le muscle squelettique. Ces travaux de DEA puis de thèse, effectués à l'UGSF, ont été réalisés sous la direction du Dr Jean-Claude MICHALSKI et du Pr Bruno BASTIDE. Après la soutenance de ma thèse en décembre 2005, j'ai intégré pour mon stage post-doctoral l'unité INSERM U744 Epidémiologie et Santé Publique, sous la direction du Dr Florence PINET. C'est lors de ce stage que j'ai pu approfondir mes connaissances dans le domaine de la physiologie du muscle strié, mais aussi de développer mes compétences dans le domaine de la protéomique, puisque mon projet d'alors consistait en la recherche de marqueurs du remodelage ventriculaire post-infarctus. Ces travaux de stage post-doctoral, effectués dans un laboratoire reconnu d'analyse protéomique, ont largement contribué aux divers développements méthodologiques mis en place au laboratoire depuis mon recrutement en tant que Maître de Conférences à l'Université de Lille 1, en 2008, et qui seront présentés dans ce mémoire.

Lorsque j'ai débuté mon DEA en 2000, il n'existait dans la bibliographie que très peu de données concernant la O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique. Nous avons alors entrepris d'identifier les protéines O-GlcNAcylées dans le muscle squelettique par analyse protéomique. Parmi les protéines identifiées, certaines catégories de protéines nous sont apparues particulièrement intéressantes de par leur rôle fondamental dans la physiologie musculaire, et ont été à l'initiative de différents projets de recherche. En effet, lors de ces premiers travaux, nous avons identifié des protéines contractiles (motrices et régulatrices de la contraction musculaire), des protéines des voies de signalisation intracellulaires (notamment de la voie PI3K-Akt), des protéines mitochondriales, ainsi que de nombreuses protéines structurales. Différents projets ont ainsi été développés, et ce à divers moments de ma carrière, concernant le rôle de la O-GlcNAcylation dans différents mécanismes de la physiologie musculaire. Ces différents travaux de recherche, concernant la caractérisation de la O-GlcNAcylation (i) dans la physiologie contractile (notamment les propriétés d'activation calcique), (ii) dans l'homéostasie protéique, et (iii) dans la cytoarchitecture sarcomérique, seront exposés de manière détaillée dans ce mémoire.

Curriculum vitae

Curriculum vitae

Etat civil

Nom patronymique : Cieniewski
Nom usuel : Cieniewski-Bernard
Prénom : Caroline
Date de naissance : 21/01/1978
Nationalité : française
Situation familiale : mariée, 1 enfant

Adresse professionnelle

URePSSS, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société
EA7369 Equipe Activité Physique, Muscle, Santé
UFR Biologie, Bâtiment SN4
Université de Lille 1
59655 Villeneuve d'Ascq
Tél : 03 20 43 42 04
Mail : caroline .cieniewski-bernard@univ-lille1.fr

Cursus académique et professionnel

2000 - 2001 **DEA Biologie-Santé**, filière « Biomolécules-Structures-Fonctions normales et pathologiques », mention très bien (Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille). Stage effectué sous la direction du Dr Jean-Claude MICHALSKI (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576) et du Dr Bruno BASTIDE (Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, UPRES 1032).

2001 - 2005 **Thèse de Doctorat des Sciences de la Vie et de la Santé**, mention Très honorable avec les félicitations du jury. Thèse effectuée sous la direction du Dr Jean-Claude MICHALSKI (Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS 8576) et du Dr Bruno BASTIDE (Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, UPRES 1032)

Titre du mémoire : Etude de la O-N-acétylglucosaminylation dans le muscle squelettique et son implication dans la physiologie musculaire.

Financement de la thèse : allocation de recherche MENRT (Ministère de l'Enseignement National, de la Recherche et de la Technologie), financement de fin de thèse de la Fondation pour la Recherche Médicale ; monitorat effectué à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

2006 - 2008 **Stage post-doctoral** effectué à l'unité INSERM U744 Epidémiologie et Santé Publique, sous la direction du Dr Florence PINET (U744 dirigée par le Pr Philippe AMOUYEL, Institut Pasteur de Lille).

Projet de recherche : Vers la caractérisation de marqueurs tissulaires et plasmatiques du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque.

Financement du stage post-doctoral : ANR Cardiovasculaire du 01/01/2006 au 31/10/2006, CDD Inserm du 01/11/2006 au 31/10/2007, bourse post-doctorale de la Fondation Lefoulon-Delalande (Institut de France) du 01/11/2007 au 29/02/2008.

2008 **Attachée Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche** du 01/03/2008 au 31/08/2008 au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Depuis le 01/09/2008 **Maitre de Conférences** à l'Université de Lille 1, section CNU : 66. Unité de recherche d'appartenance : EA7369 Activité Physique, Muscle et Santé, dirigée par les Prs Serge BERTHOIN et Bruno BASTIDE.

Publications et production scientifique

- Publications dans des revues à comité de lecture -

- [1] Lefebvre T, **Cieniewski C**, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP and Michalski JC (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem. J.* 360 : 179-188.
- [2] **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y and Michalski JC (2004) 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.
- [3] Morelle W, Jimenez JC, **Cieniewski-Bernard C**, Dei-Cas E and Michalski JC (2005) Characterization of the N-linked glycans of *Giardia intestinalis*. *Glycobiology* 15 : 549-559.
- [4] Bozzo C, Spolaore B, Toniolo L, Stevens L, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C**, Fontana G, Mounier Y and Reggiani C (2005) Nerve influence on myosin light chain phosphorylation in slow and fast skeletal muscles. *FEBS Journal.*, 272 : 5771-5785.
- [5] **Cieniewski-Bernard C**, Mounier Y, Michalski JC and Bastide B (2005) Variation of the O-GlcNAc level in skeletal muscle atrophy induced by hindlimb unloading. *J. Appl. Physiol.* 100 : 1499-1505.
- [6] Hedou J*, **Cieniewski-Bernard C***, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y and Bastide B (2007) Modulation of the contractile activity by O-linked N-acetylglucosaminylation in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 282 : 10360-10369 (* have equally contributed to this work).
- [7] **Cieniewski-Bernard C**, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C and Pinet F (2008) Proteomic analysis in cardiovascular diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 : 362-366.
- [8] Stevens L, Bastide B, Muraige CA, Dupont E, Montel V, **Cieniewski-Bernard C**, Cuisset JM, Vallée L, Mounier Y. (2008) Childhood spinal muscular atrophy induces alterations in contractile and regulatory protein isoform expressions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34 : 659-670.
- [9] Pinet F, Beseme O, **Cieniewski-Bernard C**, Drobecq H, Jourdain S, Lamblin N, Amouyel P, Bauters C. (2008) Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics* 8 : 1798-1808.

- [10] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2008) Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J Proteome Res.* 7 : 5004-5016.
- [11] **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Stevens L, Bastide B (2009) O-GlcNAcylation, an original modulator of contractile activity in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 30 : 281-287 .
- [12] Dupont E, **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Stevens L (2010) Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300 : R408-R417.
- [13] **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Berthoin S, Bastide B (2012) Increasing O-GlcNAcylation level on organ culture of soleus modulates the calcium activation parameters of muscle fibers. *PLoS One.* 7(10) : e48218.
- [14] Stevens L, Bastide B, Hedou J, **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Cochon L, Dupont E, Mounier Y (2013) Potential regulation of human muscle plasticity by MLC2 post-translational modifications during bed rest and countermeasures. *Arch Biochem Biophys* 540 : 125-1321.
- [15] Mysoet J, Canu MH, **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Dupont E (2014) Hypoactivity Affects IGF-1 Level and PI3K/AKT Signaling Pathway in Cerebral Structures Implied in Motor Control. *PLoS One* 9(9) : e107631.
- [16] **Cieniewski-Bernard C***, Dupont E*, Richard E, Bastide B (2014) Phospho-GlcNAc modulation of slow MLC2 during soleus atrophy through a multienzymatic and sarcomeric complex. *Pflugers Arch.* 466 : 2139-2151 (* have equally contributed to this work).
- [17] Rossez Y, Gosset P, Boneca IG, Magalhães A, Ecobichon C, Reis CA, **Cieniewski-Bernard C**, Joncquel Chevalier Curt M, Léonard R, Maes E, Sperandio B, Slomianny C, Sansonetti PJ, Michalski JC, Robbe-Masselot C (2014) The LacdiNAc-Specific Adhesin LabA Mediates Adhesion of Helicobacter pylori to Human Gastric Mucosa. *J Infect Dis.* 210 : 1286-1295.
- [18] **Cieniewski-Bernard C**, Lambert M, Dupont E, Montel V, Stevens L, Bastide B (2014) O-GlcNAcylation, contractile protein modifications and calcium affinity in skeletal muscle. *Frontiers in Physiology - Striated Muscle Physiology.* 5:421. doi: 10.3389/fphys.2014.00421.
- [19] **Cieniewski-Bernard C**, Dupont E, Deracinois B, Lambert M, Bastide B (2014) Multiplexed detection of O-GlcNAc, phosphoproteome and whole proteome within the same gel. *Frontiers in Endocrinology - Molecular and Structural Endocrinology.* 5:184. doi: 10.3389/fendo.2014.00184.

Articles en cours de révision ou en cours de soumission

- [20] Gamelin FX, Aucouturier J, Iannotti FA, Piscitelli F, Mazzarella E, Aveta T, Leriche M, Dupont E, **Cieniewski-Bernard C**, Leclair E, Bastide B, Di Marzo V, Heyman E (2015) Exercise training and high fat diet elicit increased CB1 cannabinoid receptor expression in the rat hippocampus. (*en revision dans Brain research*).
- [21] Lambert M, Richard E, Duban-Deweert S, Krzewinski F, Deracinois B, Dupont E, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2015) O-GlcNAcylation is a key modulator of skeletal muscle sarcomeric morphometry through modulation of protein-protein interactions. (*en revision dans J Biol Chem*).

- [22] Gamelin FX, Aucouturier J, Iannotti FA, Piscitelli F, Mazzarella E, Aveta T, Leriche M, Dupont E, **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Bastide B, Di Marzo V, Heyman E (2015) Chronic exercise reverses endocannabinoid system dysregulation in obese rats. (*soumis à J Physiol Biochem*).
- [23] Deracinois B, Camoin L, Audebert S, Dupont E, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2015) Click Chemistry as a powerful tool for identification of O-GlcNAcylated sites. (*en cours de soumission à Mol Cell Proteomics*).
- [24] Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani Y, Dupont E, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2016). Quantification of O-GlcNAc transferase using mass spectrometry. (*en cours de soumission à Rapid Comm Mass Spec*).

- *Chapitre d'ouvrage* -

Cieniewski-Bernard C, Meilhac O et Pinet F (2007) Intérêt de l'approche protéomique. *Biologie et Pathologies du cœur et des vaisseaux*, éd. John Libbey, pp 536-543

- *Publications dans des revues sans comité de lecture* -

- [1] Pinet F, **Cieniewski-Bernard C**, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C (2007) Protéomique et marqueurs cardiaques. *Médecine Nucléaire* 31 : 580-586
- [2] **Cieniewski-Bernard C**, Dupont E, Stevens L, Picquet F, Canu MH, Bastide B (2013) Plasticité musculaire et espace: du gène aux modifications post-traductionnelles. *Médecine Aéronautique et Spatiale*. Revue de question.

Encadrement doctoral et scientifique

- *Encadrement doctoral* -

Thèses en cours

- **Matthias LAMBERT** (Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille) – (2013--)
Taux d'encadrement : 50% ; co-encadrement avec le Pr Bruno BASTIDE (Lille 1).
Financement de la thèse : Contrat Doctoral Handicap, attribution DGESIP
Titre provisoire : Rôle de la O-GlcNAcylation dans les mécanismes moléculaires à l'origine du remodelage du sarcomère dans des conditions physiologiques et physiopathologiques.
Publications en premier auteur et issues de la thèse dans des revues à comité de lecture : 1 article en cours de révision (J Biol Chem)
- **Samir BEN SAID** (Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille) – (2015--)
Taux d'encadrement : 50% ; co-encadrement avec le Pr Claudine FABRE (Lille 2).
Financement de la thèse : cofinancement Région Nord-Pas-de-Calais / Université Lille 2.

Titre provisoire : Mise en place de contre-mesures pour limiter la perte protéique dans les conditions d'hypoxie cellulaire.

Master 2 Recherche

- **Tiphaine CANONNE**. M2 Biologie-Santé, Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (2011-2012). *Taux d'encadrement* : 50% (co-encadrement avec le Dr Erwan DUPONT).
Titre du mémoire : Dynamique de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation de la MLC2 dans des cellules musculaires différenciées de la lignée C2C12.
- **Floriane ADRIANSEN**. M2 Biologie-Santé, Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (2011-2012). *Taux d'encadrement* : 50% (co-encadrement avec le Pr Bruno BASTIDE).
Titre du mémoire : Caractérisation du rôle de la O-N-acétylglucosaminylation dans l'organisation structurale du sarcomère.
- **Matthias LAMBERT** (M2 Biologie-Santé, Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille) – (2012-2013). *Taux d'encadrement* : 100%.
Titre du mémoire : Rôle de la O-GlcNAcylation dans la structuration du sarcomère.
Taux d'encadrement : 100%
- **Amandine GIRARD** (M2 Biologie-Santé, Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille) – (2014-2015). *Taux d'encadrement* : 100%
Titre du mémoire : Rôle de la O-N-acétylglucosaminylation dans la modulation de l'interactome dépendant de la desmine.
- **Samir BEN SAID** (M2 Entraînement et Optimisation Physique et Sportive, Université de Lille 2) (2014-2015). *Taux d'encadrement* : 50% (co-encadrement avec le Pr Claudine FABRE, Université de Lille 2)
Titre du mémoire : Mise en place de contre-mesures pour limiter la perte protéique dans les conditions d'hypoxie cellulaire.

Encadrement scientifique

Stage post-doctoral

- **Barbara DERACINOIS** (2013-2014, 18 mois). *Taux d'encadrement scientifique* : 100%.
Titre du projet : Caractérisation du rôle de la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation dans la régulation cellulaire de la synthèse protéique dans le muscle squelettique.
Financement du stage post-doctoral : contrat de 18 mois dans le cadre du projet MYOSIGNAL (programme ANR Jeunes Chercheuses, Jeunes Chercheurs).

Master 2 Pro

- **Karen KOFFI** (M2 Chimie-Biologie, Université de Lille 1) - (2011-2012, stage de 6 mois). *Taux d'encadrement* : 100%.
Titre du mémoire : Etude de la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation de la MLC2 dans un modèle d'atrophie musculaire.

Master 1

- **Amandine GIRARD.** M1 Biologie et Biotechnologies, parcours Physiologie et Neurosciences Intégrées, Université de Lille 1 (2013-2014, stage de 6 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : O-GlcNAcylation et organisation sarcomérique du muscle squelettique.
- **François-Xavier BARBIER.** M1 Biologie et Biotechnologies, parcours Biologie Structurale et Moléculaire, Université de Lille 1 (2013-2014, stage de 4 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Analyse protéomique différentielle des protéines myofimentaires de cellules musculaires en culture.
- **Paul DUHAMEL.** M1 Génomique et Protéomique, Université de Lille 1 (2012-2013, stage 4 mois). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Analyse protéomique de la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation des protéines contractiles dans un modèle cellulaire.
- **Matthias LAMBERT.** M1 Biologie et Biotechnologies, parcours Physiologie et Neurosciences Intégrées, Université de Lille 1 (2011-2012, stage de 6 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Effets de la O-GlcNAcylation sur la structuration du sarcomère.
- **Floriane ADRIANSEN.** M1 Biologie et Biotechnologies, parcours Physiologie et Neurosciences Intégrées, Université de Lille 1 (2010-2011, stage de 6 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : La O-GlcNAcylation est-elle impliquée dans la structuration du sarcomère ?
- **Ludivine MERLOT.** M1 Protéomique, Université de Lille 1 (2006-2007, stage 4 mois). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Cartographie des protéines O-GlcNAc dans le ventricule gauche de rat.

Licence

- **Adrien MOYER.** L3 Biologie, Université de Lille 1 (2012-2013, stage de 6 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Effets de l'épinéphrine sur la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2 dans des cellules musculaires C2C12.
- **Matthias LAMBERT.** L3 Biologie Cellulaire et Physiologie, Université de Lille 1 (2010-2011, stage de 8 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Caractérisation de la O-GlcNAcylation des protéines de structure du sarcomère de cellules C2C12 en culture.
- **Magdalène WEMAERE.** L3 IUP Protéomique, Université de Lille 1 (2010-2011, stage de 4 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*
Titre du mémoire : Variation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la MLC2 dans des cellules musculaires C2C12 traitées à l'épinéphrine.
- **Perrine KAFFARA.** L3 Biologie Cellulaire et Physiologie, Université d'Artois (2009-2010, stage de 10 semaines). *Taux d'encadrement : 100%.*

Titre du mémoire : Optimisation de la détection du motif O-GlcNAc en vue de la caractérisation de la balance phosphorylation/O-GlcNAc de la MLC2 au cours de l'atrophie musculaire.

Autres formations

- **Rémi ZIMMERMAN.** DU Technique d'Elaboration et d'Analyses de Biomolécules, Université de Lille 2 (2010-2011, stage de 6 mois). **Taux d'encadrement : 100%.**
Titre du mémoire : Analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation des états de phosphorylation/O-GlcNAcylation de la MLC2.
- **Vianney HERLIN.** 2^{ème} année IUT Département Génie Biologique, Université de Lille 1. (2008-2009, stage de 8 mois). **Taux d'encadrement : 100%.**
Titre du mémoire : Étude de la O-N-acétylglucosaminylation des protéines contractiles du muscle squelettique.
- **Magdalène WEMAERE.** DU Technique d'Elaboration et d'Analyses de Biomolécules, Université de Lille 2 (2009-2010, stage de 6 mois). **Taux d'encadrement : 100%.**
Titre du mémoire : Modulation de la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2 au cours de l'atrophie fonctionnelle.
- **Lucie DERUYTER.** 1^{ère} année de BTS Biotechnologies, Lycée Valentine Labbé (2006-2007, stage de 2 mois). **Taux d'encadrement : 100%.**
Titre du mémoire : Optimisation de la séparation électrophorétique de protéines du ventricule gauche de rat.
- **Emilie DESRUELLE.** 2^{ème} année de BTS Biotechnologies, Lycée Valentine Labbé (2007-2008, stage de 2 mois). **Taux d'encadrement : 100%.**
Titre du mémoire : Analyse protéomique différentielle de protéines du ventricule gauche post-infarctus.

Rayonnement scientifique

Remarque : pour les communications orales et communications par affiche, est souligné le nom de l'auteur désigné pour la présentation.

- Communications orales -

- [1] **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Mounier Y and Michalski JC (2002) O-linked-acetylglucosamine in normal and atrophied skeletal muscle. *13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie*, Münster/Raesfeld, Allemagne.
- [2] **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Mounier Y, Lefebvre T and Michalski JC (2003) La O-N-acétylglucosaminylation dans le muscle squelettique normal et atrophie. *3^{ème} Journée André Verbert, Colloque Annuel des Doctorants*, Villeneuve d'Ascq, France.
- [3] **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Mounier Y, and Michalski JC (2003) O-linked N-acetylglucosaminylation in normal and atrophied skeletal muscle. *Eurocarb12 Symposium*, Grenoble, France.
- [4] Bastide B, **Cieniewski-Bernard C**, Stevens L, Bozzo C, Lemoine J, Michalski JC, and Mounier Y (2003) Characterization of some post-translational modifications in rat skeletal muscle. *Société Française de Myologie*, Caen, France.

- [5] Bastide B, **Cieniewski-Bernard C**, Stevens L, Bozzo C, Michalski JC, and Mounier Y (2004) O-linked N-acetylglucosaminylation and phosphorylation : two key post-translational modifications involved in disuse conditions in skeletal muscle. *II^{èmes} Journées de la Société Française de Myologie*, Saint-Etienne, France.
- [6] **Cieniewski-Bernard C** (2006) Etude de la O-GlcNAc : apport de l’outil protéomique.” *Nouvelles perspectives en protéomique – Cycle de séminaires 2006 – Sigma-Aldrich*, Lille, France. **Conférence sous invitation.**
- [7] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Dubois E, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2007) Etude des variations de phosphorylation lors du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d’insuffisance cardiaque. *Congrès de la Nouvelle Société Française d’Athérosclérose*, Biarritz, France.
- [8] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Drobecq H, Thuillez C, Amouyel P, Richard V and Pinet F (2008) Left ventricle proteins modulated during post-infarction remodelling in an experimental model of heart failure. *Journées Européennes de Cardiologie*, Paris, France. **Prix obtenu lors de la session « Compétition Jeunes Chercheurs ».**
- [9] **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Stevens L, Bozzo C, Bastide B (2009) Effect of an increase of O-GlcNAc level on calcium activation properties of skinned fibers isolated from soleus muscle. *38th European Muscle Conference*, Lille, France. **Communication avec actes.**
- [10] Dubois E, **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2009) Etude du phosphoprotéome lors du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d’insuffisance cardiaque. *26ème Congrès de Biologie et Pathologies du Coeur et des Vaisseaux*, Nancy, France.
- [11] **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Bastide B (2010) Modulation of contractile activity by MLC2 O-GlcNAcylation. *39th European Muscle Conference*, Abano Terme, Italie. **Communication avec actes**
- [12] **Cieniewski-Bernard C**, Dupont E, Richard E, Bastide B (2012) Dynamique de phosphorylation/O-GlcNAcylation de la MLC2 lors de l’atrophie fonctionnelle du muscle squelettique – Implication fonctionnelle d’un complexe multienzymatique sarcomérique. *Société Française d’électrophorèse et d’analyse protéomique*, Rouen, France.
- [13] **Cieniewski-Bernard C** (2013) Glycoprotéomique & glycomique : quelle stratégie expérimentale choisir ?. *Ateliers Technologiques de BioCampus*, Montpellier, France. **Conférence sous invitation.**
- [14] **Cieniewski-Bernard C** (2013) Quels outils pour l’étude du phosphoprotéome et du glycoprotéome ?. *9^{èmes} journées du Club-Jeunes de la SFEAP*, Strasbourg France. **Conférence sous invitation.**
- [15] Lambert M, Richard E, Duban-Deweert S, Krzewinski F, Deracinois B, Dupont E, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2014) O-GlcNAcylation modulates sarcomeric organization and protein-protein interactions in C2C12 myotubes. *43rd European Muscle Conference*, Salzburg, Autriche. **Communication avec actes.**
- [16] Dupont E, Cochon L, **Cieniewski-Bernard C**, Stevens L, Bastide B (2015) Modulation of PI3K-AKT pathway and O-GlcNAcylation after a 21 day Bed-Rest. *International Society for Gravitational Physiology*, Ljubljana, Slovénie.
- [17] Lambert M, Richard E, Duban-Deweert S, Krzewinski F, Deracinois B, Dupont E, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2015) O-GlcNAcylation in skeletal muscle: a key regulator of the sarcomeric structure? 15^{ème} journée André Verbert, Lille, France.

- [1] Lefebvre T, **Cieniewski-Bernard C**, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Planque N, Dupire MJ, Bailly M, Delacourte A, Zanetta JP, Saule S, Caillet-Boudin ML, Michalski JC (2001) What role for O-GlcNAc ?. *Glyco XVI*, La Haye, Pays-Bas.
- [2] **Cieniewski C**, Bastide B, Lefebvre T, Leroy Y, Mounier Y, and Michalski JC (2002) Proteomic analysis of O-linked β -N-acetyl-glucosaminyl proteins in control and atrophied skeletal muscles. *Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique*, Lille, France.
- [3] **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Lefebvre T, Leroy T, Michalski JC and Mounier Y (2002) O-linked β -N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle under control conditions and after hindlimb unloading. *31st Annual Meeting of the European Society for Muscle Research*, Lunteren, Pays-Bas. **Communication avec actes.**
- [4] Bastide B, **Cieniewski-Bernard C**, Stevens L, Bozzo C, Lemoine J, Michalski JC and Mounier Y (2003) Characterization of some post-translational modifications in rat skeletal muscle. *Société Française de Myologie*, Caen, France.
- [5] Bozzo C, **Cieniewski-Bernard C**, Stevens L, Bastide B, Mounier Y (2004) Influence du facteur nerveux dans les phénomènes de régulation post-traductionnelle des protéines contractiles du muscle squelettique. *8^{ème} journée Scientifique du réseau LARC-Neurosciences*, Paris, France.
- [6] **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Mounier Y, Michalski JC (2005) The potential implication of O-GlcNAc in skeletal muscle atrophy induced by hindlimb unloading. *Congrès international HUPO Human Proteomic*, Munich, Allemagne. **Bénéficiaire d'une bourse de congrès HUPO.**
- [7] Hedou J, **Cieniewski-Bernard C**, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y, Bastide B (2006) O-GlcNAc is a post-translational modification involved in the modulation of the contractile activity in rat skeletal muscle. *35th European Muscle Congress*, Heidelberg, Allemagne. **Communication avec actes.**
- [8] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Beseme O, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2006) Identification de marqueurs du remodelage ventriculaire post-infarctus par analyse protéomique dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *Printemps de la Cardiologie*, Toulouse, France.
- [9] Hedou J, **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Mounier Y (2006) O-GlcNAc is a post-translational modification involved in the development of atrophy and regulation of the contractile activity in rat skeletal muscle. *27th Annual international Gravitational Physiology Meeting*, Osaka, Japon.
- [10] **Cieniewski-Bernard C**, Dubois E, Mulder P, Drobecq H, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2006) Are O-N-acetylglucosaminylation and phosphorylation implicated in heart diseases, like post-infarction left ventricular remodeling ? *16th meeting of Methods in Protein Structural Analysis*, Lille, France.
- [11] Hedou J, **Cieniewski-Bernard C**, Leroy Y, Stevens L, Falempin M, Michalski JC, Mounier Y, Bastide B (2006) Implication of O-linked N-acetylglucosaminylation in the contractile activity in skeletal muscle. *16th meeting of Methods in Protein Structural Analysis*, Lille, France.
- [12] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Beseme O, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2006) Identification of post-infarction left ventricular remodelling biomarkers using proteomic analysis in an experimental model of heart failure. *10th meeting of European Council for Cardiovascular Research*, Nice, France. **Communication avec actes.**

- [13] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Beseme O, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2006) Identification de marqueurs du remodelage ventriculaire post-infarctus par analyse protéomique dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *1ère journée SELDI de Xavier Bichat : Colloque Francophone des utilisateurs SELDI-TOF*, Paris, France.
- [14] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2007) Analyse protéomique différentielle du tissu ventriculaire gauche dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *24ème Congrès de Biologie et Pathologies du Coeur et des Vaisseaux*, Tours, France.
- [15] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Dubois E, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2007) Etude des variations de phosphorylation et de O-N-acétyl-glucosaminylation dans le ventricule gauche après un infarctus du myocarde dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *24ème Congrès de Biologie et Pathologies du Coeur et des Vaisseaux*, Tours, France.
- [16] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2007) Identification de protéines cardiaques modulées dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *Printemps de la Cardiologie de Lille*, Lille, France.
- [17] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Dubois E, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2007) Etude des variations de phosphorylation lors du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose*, Biarritz, France.
- [18] **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2007) Identification of left ventricle proteins modulated in an experimental model of heart failure." *10th meeting of European Council for Cardiovascular Research*, Nice, France. **Communication avec actes.**
- [19] **Dubois E**, **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2008) Etude de la phosphorylation des protéines lors du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *25ème Congrès de Biologie et Pathologies du Coeur et des Vaisseaux*, Montpellier, France. **Prix du meilleur poster.**
- [20] **Dubois E**, **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2008) Phosphoproteome analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *11th meeting of European Council for Cardiovascular Research*, Nice, France. **Communication avec actes.**
- [21] **Dubois E**, **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2009) Etude du phosphoproteome lors du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. *9^{ème} Journée André Verbert, Colloque Annuel des Doctorants*, Lille, France.
- [22] **Dubois E**, **Cieniewski-Bernard C**, Mulder P, Drobecq H, Flahaut C, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2009) Study of post-translational modifications of contractile proteins in left ventricular remodeling. *12th meeting of European Council for Cardiovascular Research*, Nice, France. **Communication avec actes.**
- [23] **Dupont E**, **Cieniewski-Bernard C**, Bastide B, Stevens L (2010) Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *39th European Muscle Conference*, Abano Terme (Italie). **Communication avec actes.**
- [24] **Leclair E**, **Gamelin FX**, **Cieniewski-Bernard C**, **Dupont E**, **Attoumani Y**, **Bastide B**, **Heyman E** (2010) Effect of exercise training on skeletal muscle CB1 receptor in rats. *1^{er} symposium European Genomic Institute for Diabetes (EGID)*, Lille, France.

- [25] Leclair E, Heyman E, **Cieniewski-Bernard C**, Dupont E, Bastide B, Gamelin FX (2010) Effect of exercise training on skeletal muscle CB1 receptor in rats. 1^{er} Symposium EGID. Lille, France.
- [26] **Cieniewski-Bernard C**, Montel V, Bastide B (2011) Modulation of contractile activity by O-GlcNacation. Congrès International de Myologie, Lille, France.
- [27] Deracinois B, Dupont E, Duban-Deweere S, Camoin L, Richard E, Lambert M, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2013) Study of the Phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay in differentiated C2C12 myotubes: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Société Française d'électrophorèse et d'analyse protéomique*, Saint-Malo, France.
- [28] Dupont E, Cochon L, **Cieniewski-Bernard C**, Stevens L, Bastide B (2013) Effects of a 21 day Bed Rest on the PI3K-AKT pathway : role of O-GlcNAc. *42th European Muscle Conference*, Amsterdam, Pays-Bas **Communication avec actes**.
- [29] Deracinois B, Dupont E, Richard E, Lambert M, Bastide B, **Cieniewski-Bernard C** (2014) Phosphorylation/O-GlcNAcylation interplay in the modulation of protein synthesis: focus on the IGF-1 pathway in differentiated C2C12 myotubes. *43rd European Muscle Conference*, Salzbourg, Autriche. **Communication avec actes**.

Responsabilités scientifiques

Porteur de projets de recherche contractualisés

- **2008-2009 : BQR Bonus Qualité Recherche (BQR)** à l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Projet : Détermination du rôle de la balance phosphorylation/O-GlcNAc dans la physiologie contractile du muscle squelettique et de son implication dans l'atrophie fonctionnelle de non-utilisation. Budget : **10 000€**.
- **2012-2015 : ANR Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs**. Projet MYOSIGNAL : Caractérisation du rôle de la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation dans la régulation cellulaire de la synthèse protéique dans le muscle squelettique (décision n°11JSV800601). Budget obtenu : **239 998 €** ; durée : 36 mois.
- **2013-2014 : Projets émergents, région Nord-Pas-de-Calais**. Projet : Rôle de la O-GlcNAcylation dans la structuration du sarcomère et sa réorganisation au cours de pathologies musculaires (subvention REGION N°12 00 38 03). Budget obtenu : **45 600 €** ; durée : 24 mois.
- **2014-2015 : Trampoline Grant, AFM-Téléthon**. Projet de recherche collaboratif HIGHPEP-PATH : High throughput measurement of signaling pathway activation in skeletal muscle cells. (décision AFM 16986). Budget obtenu : **46 900 €** ; durée : 12 mois.

Implication dans d'autres projets de recherche contractualisés

- **CNES (Centre National d'Etudes Spatiales) - Contrats pluriannuels**
Projet : Plasticité Neuromusculaire et Environnement Gravitaire (montants : 30 k€, 32 k€, 29 k€, 19k€ pour les années 2010-2011, 2011-2012, 2012-2013, 2013-2014 respectivement). Porteurs de projets : Prs B.Bastide et L.Stevens.
- **AFM (Association Française contre les Myopathies)**

Projet : Functional and proteomic analysis of the role of O-linked N-acetylglucosamylation in skeletal muscle physiology (montant : 30 k€). Porteur de projet : Pr B.Bastide.

- **ANR (Agence Nationale de la Recherche)**

Projet : AdapHyg (montant : 60 k€). Porteur de projet de recherche collaboratif : Pr JL.Morel (Bordeaux).

*Développement de nouvelles collaborations locales et nationales
dans le cadre des projets de recherche*

- **Marseille Protéomique**, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille - Aix-Marseille Université, Institut Paoli-Calmettes INSERM U1068 - CNRS UMR7258, Marseille (Dr L. Camoin)
- **Plate-forme Synthèse Nanobio**, Université Joseph Fourier, Département de Chimie Moléculaire, Grenoble (Dr R. Lartia)
- **Unité de Chimie des Biomolécules**, CNRS UMR 3523, Institut Pasteur, Paris (Dr S. Bay)
- **Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato-Encéphalique**, Plateforme d'Analyse Protéomique de l'Artois, Faculté Jean Perrin, Université D'Artois (Dr S. Bubandeweer, Y. Hachani)
- **Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle**, CNRS UMR 8576, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq (Drs C. Robbe-Masselot, F. Krzewinski, B. Coddeville)
- **Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire**, Plateforme BICeL, Université de Lille 1 (Dr C. Slommianny, E. Richard, AS Lacoste)

Activités d'enseignement

- Enseignement effectué à l'Université de Lille 1 à raison de 192 h Eq.TD/an.
- **Enseignement effectué en Licence :**
 - Licence SVT (CAPES-AGREG) : Neurophysiologie (CM ; TD, TP)
 - Licence Sciences de la Vie de la Terre : Physiologie Animale (CM, TD)
 - Licence Sciences Technologies Santé – SVTE : Physiologie cellulaire (CM, TD, TP), Physiologie des grandes fonctions (TP), PPP2 (TD)
 - Licence Sciences de la Vie – Parcours Biologie Cellulaire & Physiologie : Physiologie de la Communication (TD), Neurophysiologie Intégrée (TP), Physiologie Sensorimotrice (TD, TP), Homéostasie & régulation des fonctions physiologiques (TP), stage
- **Enseignement effectué en Master :**
 - Master 1 Biologie & Biotechnologies : Physiologie Neuromusculaire (CM, TD), Biotechnologies en Physiologie (TP), Stage de détermination professionnelle (TD)
 - Master 2 Biologie-Santé : Journée thématique
 - Master 2 Chimie Bioanalytique : Stratégie d'analyse des biomolécules (CM)
 - Master 1 et Master 2 MEF Biotechnologies – ESPE : Biochimie & biologie moléculaire (CM)

- Responsable de l'UE Physiologie Animale (Licence Sciences de la Vie de la Terre)

Remarque : Décharge d'enseignement de 64 Eq.TD/an au cours de l'année de recrutement, et de l'ordre de 80 Eq.TD/an pendant 3 ans (ANR MYOSIGNAL)

Autres activités et responsabilités

- Membre du comité de direction de l'EA4488 (2010-2013)
- Membre du vivier de l'Université de Lille 1 pour la section CNU 66
- Membre de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique et de l'European Society for Muscle Research
- Expertises pour des journaux scientifiques (J Muscle Res Cell Motil, J Biomol Res & Therapeutics, BioMed Research International, Cell Biochem and Function)
- Review Editor (Frontiers Editorial Board)
- Evaluation de projets scientifiques
- Gestion technique d'un Marché à Procédure Adaptée dans le cadre de l'ANR Jeunes chercheuses et jeunes chercheurs - projet MYOSIGNAL
- Participation à différentes formations en vue d'acquérir de nouvelles connaissances et compétences techniques ou scientifiques pour le développement de futurs projets de recherche
 - Imagerie par spectrométrie de masse MALDI, Lille (**2014**)
 - Certificat d'expérimentation animale niveau 1, Institut Pasteur Lille (**2012**)
 - Ecole chercheur Interactomique : apports de la spectrométrie de masse et des approches protéomiques, La Grande Motte (**2012**)
 - Première journée « Protéomique et maladies rares », Paris (**2012**)
 - École thématique du CNRS Chromatographies et Spectrométries de Masse (**2010**).
 - Organisation de l'atelier « Glycobiologie et lectines » au congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Lille (**2002**).
 - Publications visant à la diffusion des connaissances : conférences données dans des collèges et lycées dans le cadre de l'opération « 1 000 chercheurs dans les écoles » organisée par l'AFM-Téléthon (**2013, 2014 et 2015**).

Introduction

Première partie

Le muscle squelettique

Première partie : le muscle squelettique

Le muscle squelettique est un tissu doté d'une remarquable capacité de plasticité, correspondant ainsi à l'un des tissus les plus dynamiques et plastiques de l'organisme. Chez l'Homme, le muscle squelettique représente environ 40% de la masse corporelle. Il est composé de 50 à 75% du pool protéique total, et est responsable à lui seul de 30 à 50% du turn-over protéique dans l'organisme. Le muscle squelettique participe à de nombreuses fonctions de l'organisme. D'un point de vue mécanique, la fonction principale du muscle squelettique est la conversion d'une énergie chimique en énergie mécanique afin de générer une force, de produire un mouvement ou d'assurer le maintien de la posture. D'un point de vue métabolique, le muscle squelettique contribue au métabolisme basal, servant de « réservoir » pour différents substrats tels que les sucres ou les acides aminés et participe également, par la production de chaleur, au maintien de la température. Au contraire, lors d'une activité physique, il sera le principal utilisateur des substrats énergétiques et de la consommation d'oxygène. Le muscle squelettique occupe une place centrale dans le métabolisme de l'organisme, notamment le métabolisme protéique ; en effet, il a un rôle important en tant que « réserve » en acides aminés, et est donc impliqué dans l'homéostasie protéique de certains tissus et organes (tels que la peau, le cerveau, le cœur, et le foie), ainsi que dans le maintien de la glycémie dans des conditions de jeûne prolongé (Frontera & Ochala, 2015 ; Wolfe, 2006) Ainsi, une réduction de la masse musculaire peut impacter la capacité de l'organisme à répondre au stress ou à des maladies chroniques.

1. Du muscle squelettique aux fibres musculaires.

1.1. Organisation macroscopique.

A l'échelle macroscopique, l'ensemble du muscle est recouvert d'une gaine de tissu conjonctif lâche, l'épimysium. A l'intérieur de cette couche sont disposées les fibres musculaires réunies en faisceaux, qui sont eux délimités par le péri-mysium. Cette enveloppe de tissu conjonctif contient les vaisseaux sanguins nécessaires à l'irrigation du muscle, se prolongeant par des capillaires permettant d'atteindre les composantes les plus profondes du muscle. A l'intérieur de ces faisceaux, chacune des fibres musculaires est elle-même entourée d'une autre couche de tissu conjonctif lâche appelée endomysium. Chaque fibre musculaire est ensuite entourée d'une membrane plasmique, le sarcolemme, qui abrite le sarcoplasme contenant les nombreux noyaux cellulaires, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ainsi que d'autres organites plus ou moins spécialisés. Chacune des fibres musculaires est une longue cellule cylindrique renfermant de nombreux noyaux ovales situés juste au-dessous du sarcolemme. Les cellules des muscles squelettiques sont de grande taille, puisque leur longueur varie de 1 mm à plusieurs centimètres, et leur diamètre se situe entre 10 et 100 μm . Les différents niveaux d'organisation du muscle strié sont représentés figure 1.

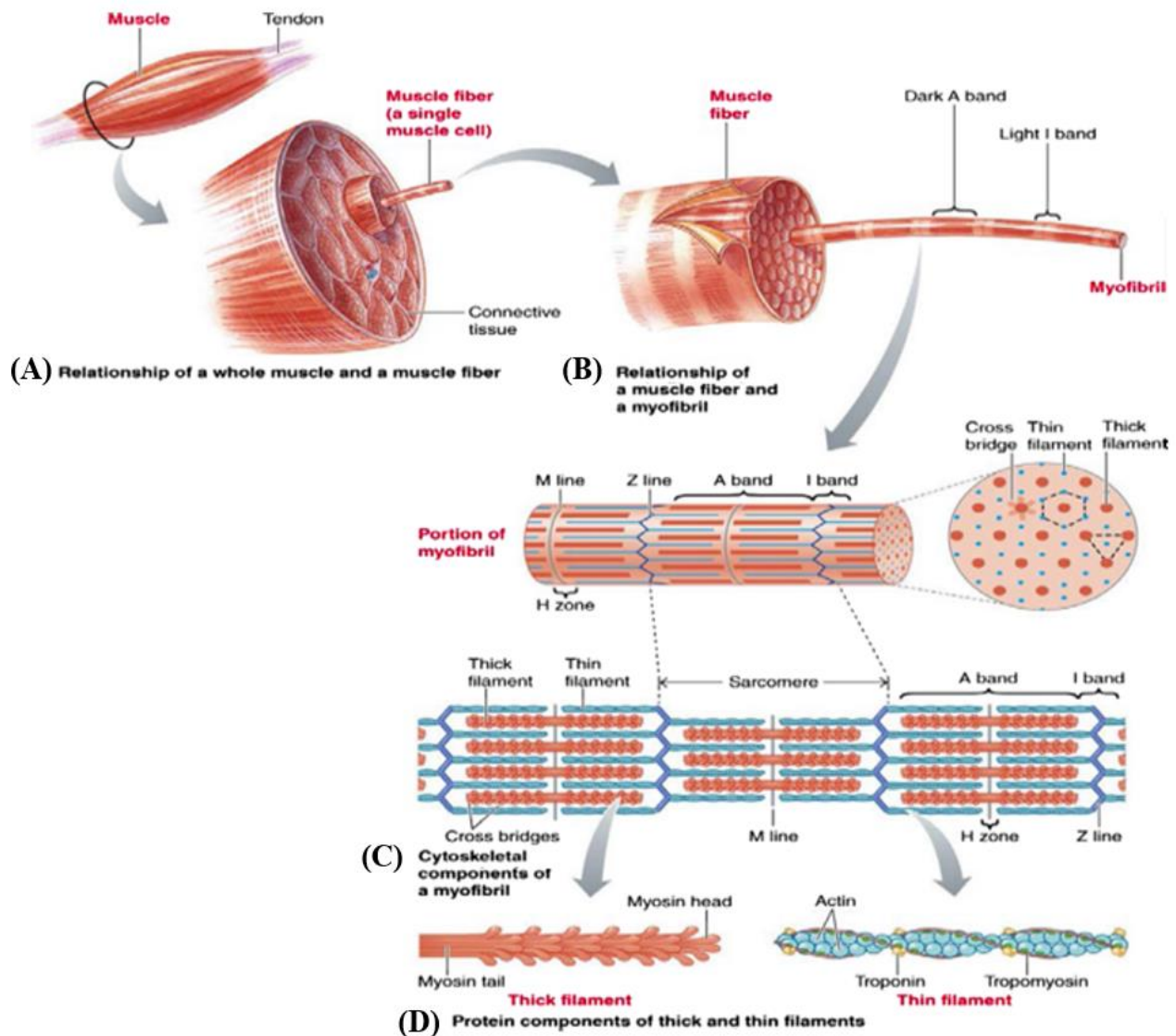


Figure 1 : Structure du muscle squelettique. (d'après Frontera & Ochala, 2015).

1.2. Organisation microscopique : les sarcomères.

A l'échelle microscopique, la fibre musculaire contient de nombreuses structures cylindriques appelées myofibrilles, structures complexes composées de groupes de filaments. Ces myofibrilles constituent l'élément contractile du muscle squelettique, et chacune d'elles possède plusieurs unités contractiles : les sarcomères. Ceux-ci sont majoritairement constitués de plusieurs myofilaments minces d'actine, et de myofilaments épais de myosine, dont l'agencement donne naissance à différents types de stries et de bandes, représentés figure 2. Sur la longueur de chaque myofibrille, on remarque une alternance de bandes sombres (bandes A, anisotropes) et de bandes claires (bandes I, isotropes). Dans une fibre musculaire intacte, les bandes des myofibrilles sont parfaitement alignées, et se poursuivent sur toute la longueur de la cellule ; c'est pour cette raison que l'ensemble du muscle paraît strié.

La bande M, coupant chaque bande A en son milieu, n'est visible que lorsque les fibres musculaires sont au repos. Au milieu des bandes I, on remarque également une zone

plus foncée nommée strie Z. La région d'une myofibrille comprise entre deux stries Z successives est appelée sarcomère (littéralement « segment de muscle »). Chaque unité fonctionnelle du muscle squelettique est donc une très petite portion de myofibrille, et on peut représenter chaque myofibrille comme une chaîne de sarcomères en série. Au niveau moléculaire, on constate que les stries des myofibrilles sont formées par la disposition ordonnée des myofilaments fins et épais. Ces filaments sont reliés parallèlement entre eux au centre du sarcomère par la ligne M. Tandis que les myofilaments d'actine et de myosine interagissent pour générer la force de contraction, d'autres protéines forment un véritable réseau, qualifié aujourd'hui de « cytosquelette sarcomérique » (Gautel, 2011), dont le but est de réguler la structure du sarcomère et d'assurer son fonctionnement. Ainsi, un « troisième filament », constitué par la titine, va intervenir dans la préservation de l'intégrité structurale des deux myofilaments, et s'étend de la strie Z à la ligne M. Troisième protéine la plus abondante du sarcomère après la myosine et l'actine, la titine, qualifiée de « colonne vertébrale » du sarcomère (Labeit et al., 1997), est impliquée dans l'élasticité du sarcomère et la conservation de la position relative des filaments d'actine et de myosine (Tskhovrebova & Trinick, 2003).

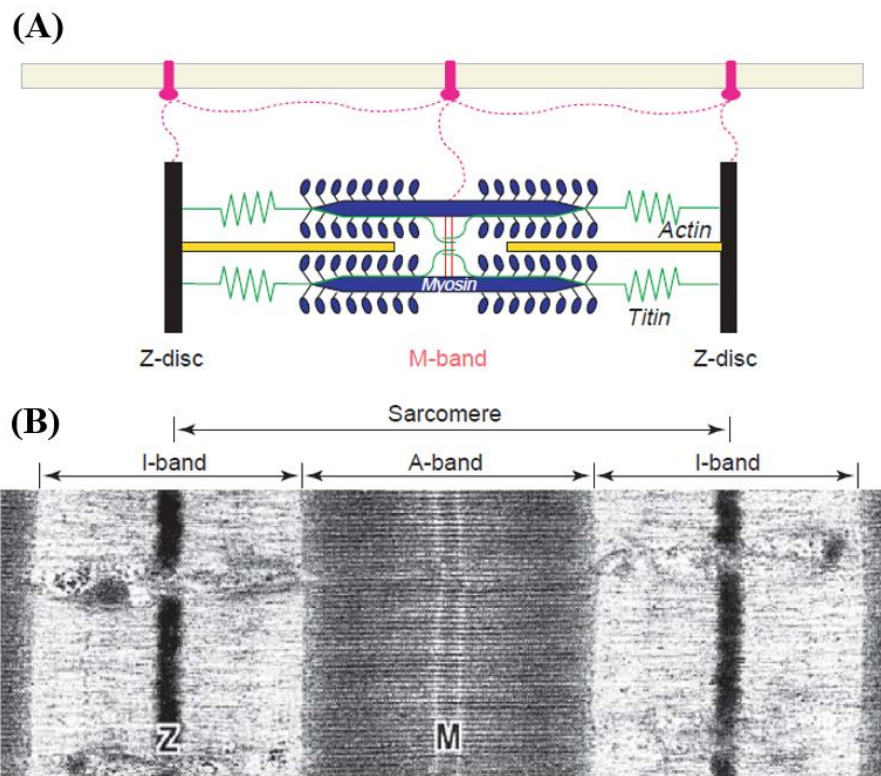


Figure 2 : Représentation schématique du sarcomère, unité structurale fonctionnelle du muscle strié squelettique. (A) Représentation simplifiée des structures sarcomériques ; en jaune, les filaments d'actine, en bleu les filaments de myosine, en vert les filaments de titine. Les structures transverses sont les stries (ou disques) Z (en noir) et la bande M (en rouge). Des filaments extrasarcomériques (magenta) sont ancrés à des protéines transmembranaires du sarcolemme. (B) Sarcomère squelettique observé par microscopie électronique. Notez l'alternance de bandes claires et de bandes sombres. (d'après Agarkova & Perriard, 2005).

2. Protéines impliquées dans les propriétés contractiles du muscle squelettique et mécanisme de la contraction musculaire.

Les fibres musculaires squelettiques sont extrêmement riches en protéines, puisqu'elles sont constituées d'environ 80% de leur poids sec de protéines, et de l'ordre de 8% de sarcoplasme (Hoppeler et al., 1973). Il existe trois grandes catégories de protéines : les protéines contractiles (retrouvées au niveau des filaments épais et des filaments fins), les protéines régulatrices (retrouvées essentiellement au niveau des filaments fins et des filaments épais), et les protéines structurales (servant d'ossature au sarcomère, et responsables de l'organisation quasi-cristalline du sarcomère). Les deux protéines myofilamentaires les plus abondantes sont les protéines motrices (actine et myosine), représentant à elles seules 40% du contenu protéique total (Gelfi et al., 2011). Le sarcomère et le sarcoplasme sont également très riches en de nombreuses protéines structurales (qui seront détaillées dans le paragraphe 3. « La cytoarchitecture sarcomérique. ») contribuant à la structure du cytosquelette, au processus de couplage excitation-contraction, et à la genèse d'une force.

2.1. Protéines constitutives du filament épais de myosine.

La myosine est une protéine asymétrique et hexamérique, constituée de deux chaînes lourdes d'environ 200 kDa chacune, auxquelles sont associées deux paires de chaînes légères d'approximativement 20 kDa chacune (Warrick & Spudich, 1987). Les deux chaînes lourdes de myosine interagissent au niveau de leur partie C-terminale, formant une hélice α (la « queue » de la myosine). La partie N-terminale de chaque chaîne lourde forme une tête globulaire de telle manière que chaque molécule de myosine contienne deux têtes (figure 3). La région tige est responsable de l'agrégation des molécules de myosine en filaments épais bipolaires, tandis que la tête de myosine porte l'activité ATPasique et est responsable de l'interaction avec l'actine (Gelfi et al., 2011). Au niveau du sarcomère, on compte environ 600 molécules de myosine dont les « queues » sont orientées vers la centre du sarcomère, formant ainsi les filaments épais de myosine, de 1,5 μm de longueur et de 15 nm de diamètre, tandis que les « têtes » de myosine dépassent du filament à un angle d'environ 60° afin d'interagir avec l'actine (figure 3).

Les chaînes lourdes de myosine sont constituées de deux domaines : la queue de myosine ou méromyosine légère (LMM : light meromyosin), et une partie globulaire ou méromyosine lourde (HMM : heavy meromyosin) (Lowey et al., 1969). Cette partie globulaire est elle-même constituée d'une tête globulaire S1 et d'une portion fibrillaire S2. La tête S1 correspond à l'association de trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa, le domaine moteur correspondant aux sous-unités de 50 et 20 kDa. C'est cette partie de la molécule de myosine, possédant le site de fixation de l'ATP, qui va interagir avec l'actine. La sous-unité de 20 kDa sert de point d'ancrage des chaînes légères au domaine moteur.

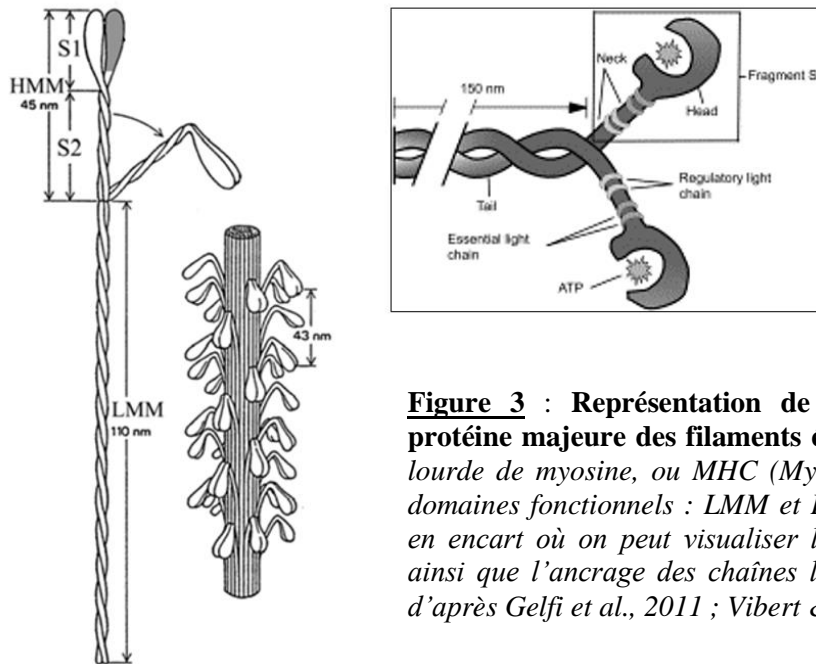


Figure 3 : Représentation de la molécule de myosine, protéine majeure des filaments épais. Structure de la chaîne lourde de myosine, ou MHC (Myosin Heavy Chain) avec ses domaines fonctionnels : LMM et HMM, et détail de la tête S1 en encart où on peut visualiser le site de fixation de l'ATP, ainsi que l'ancrage des chaînes légères de myosine. (modifié d'après Gelfi et al., 2011 ; Vibert & Cohen, 1988).

Les muscles de Mammifères contiennent dix isoformes sarcomériques de MHC, les isoformes prédominantes dans les muscles squelettiques étant la MHC I ou MHC β /s (isoforme β cardiaque ou slow), la MHC II A, la MHC II X/II D et la MHC II B (Gelfi et al., 2011 ; Schiaffino & Reggiani, 1996). Dans le muscle rapide, les isoformes MHC II A, MHC II B et MHC II X/II D sont coexprimées, tandis que dans le muscle lent, l'isoforme MHC I est largement prédominante. L'expression des MHC est sensible à différents stimuli, et les MHC sont couramment utilisées comme marqueurs de la plasticité musculaire et des réponses adaptatives (Pette, 2001).

Associées aux chaînes lourdes de myosine, on va distinguer quatre chaînes légères de myosine. Ainsi, au niveau de chacune des deux têtes de myosine, on retrouve une chaîne légère essentielle (ou catalytique) dite MLC1, et une chaîne légère phosphorylable (ou régulatrice) dite MLC2. De par leur localisation au niveau de la région charnière entre la tête et la tige, les chaînes légères de myosine sont impliquées dans la modulation des interactions entre l'actine et la myosine. Comme pour les MHC, il existe des isoformes lentes et rapides de ces chaînes légères de myosine.

2.2. Protéines constitutives du filament fin.

L'actine. Les filaments fins, dont le diamètre varie entre 5 et 7 nm, sont principalement constitués d'actine. L'actine monomérique est une protéine globulaire de 43 kDa, qui a la propriété de se polymériser en milieu salin pour former un filament polaire (actine F). Dans le sarcomère, l'actine G va former des filaments d'un diamètre de 8 nm, aboutissant à la formation d'une hélice serrée. Il en résulte une structure en double hélice, les deux brins d'actine tournant l'un autour de l'autre tous les 37 nm (figure 4). Chaque globule d'actine possède un site d'interaction pour les têtes de myosine (Holmes et al., 1990), interaction moléculaire à la base de la contraction musculaire. Il existe deux isoformes d'actine dans les

muscles sarcomériques : l' α -actine squelettique et l' α -actine cardiaque, chacun des variants étant codé par un gène distinct (Vandekerckhove et al., 1986).

Plusieurs protéines de régulation sont également présentes au niveau du filament fin, en particulier la tropomyosine, qui s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale d'actine, et le complexe des troponines, avec notamment la troponine C, la troponine I et la troponine T (figure 4).

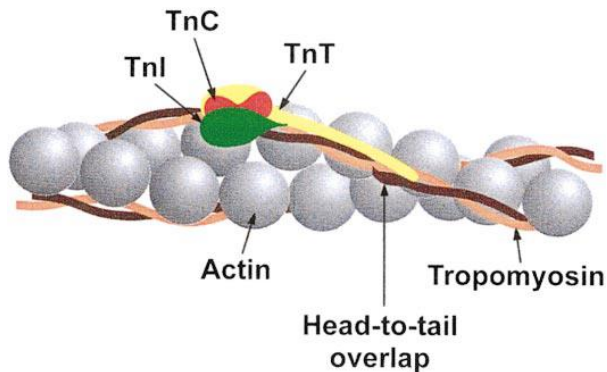


Figure 4 : Modèle de l'arrangement moléculaire des troponines, de la tropomyosine et de l'actine au sein du filament fin. Les sous-unités du complexe des troponines (TnC en rouge, TnT en jaune et TnI en vert) sont liées au filament de tropomyosine (double brin, en brun et orange) avec une périodicité correspondant à 7 monomères d'actine (en gris). (d'après Gordon et al., 2000).

La tropomyosine. Ces filaments d'actine constituent la charpente du filament fin, sous forme d'une double hélice avec un sillon au niveau duquel va venir se loger le filament de tropomyosine (Flicker et al., 1982). Il existe deux isoformes de tropomyosine dans le muscle strié, appelées α et β (Cummins & Perry, 1973), s'assemblant en homo- ou en hétérodimères. Le ratio entre les sous-unités α et β est spécifique de l'espèce et du muscle considéré ; ainsi, l'isoforme α est plus spécifiquement exprimée dans les fibres rapides, tandis que l'isoforme β est plus spécifique des fibres lentes (Muthuchamy et al., 1997). Le positionnement de la tropomyosine est régulé par le complexe des troponines composé de trois sous-unités protéiques : la troponine C (TnC), la troponine T (TnT) et la troponine I (TnI). Le complexe des troponines est disposé tous les sept monomères d'actine, soit tous les 38.5 nm. Pourtant, la liaison du Ca^{2+} sur le filament fin s'effectue de manière coopérative (Grabarek et al., 1983), la tropomyosine propageant l'information le long du filament fin pour assurer la coopération.

La troponine C. La TnC (C pour calcium) joue un rôle majeur dans la régulation de la contraction par le calcium ; c'est une protéine « calcium sensor », capable de détecter les variations de calcium cytosolique et de lever l'interaction actine-myosine due au positionnement de la troponine I (Parmacek & Leiden, 1991). La TnC appartient à la superfamille des protéines CaBP (Calcium Binding Protein), incluant la calmoduline, les chaînes légères de myosine essentielles et régulatrices, et la parvalbumine ; ces protéines sont caractérisées par un ou plusieurs site(s) de fixation du Ca^{2+} de type hélice-boucle-hélice. Les muscles striés contiennent deux isoformes de la TnC, dérivant de gènes distincts : la TnC rapide ou TnCf (TnC fast), exprimée dans les muscles squelettiques rapides (Dhoot et al., 1979), et la TnC lente ou TnCs (TnC slow) exprimée à la fois dans les muscles squelettiques lents et le cœur (Wilkinson, 1980). La différence majeure entre les deux isoformes réside dans l'une des boucles fixatrices des ions calcium ; tandis que l'isoforme rapide contient quatre

boucles fixatrices des ions calcium (Potter & Gergely, 1975), il manque à la TnC un site de basse affinité.

La troponine I. La TnI (I pour inhibitrice de la contraction) est une protéine fixant l'actine et inhibant l'activité ATPase du complexe actomyosine (Greaser & Gergely, 1973), l'inhibition étant augmentée en présence de la tropomyosine (Perry & Cole, 1974). La TnI présente également un effet inhibiteur de l'activité ATPasique du complexe actine-S1 (Levine et al., 1988 ; Syska et al., 1976). Les muscles striés contiennent trois isoformes de TnI : la TnI rapide ou TnIf (TnI fast), la TnI lente ou TnIs (TnI slow) et la TnI cardiaque ou TnIc (Hartner & Pette, 1990).

La troponine T. La TnT (TnT) est une protéine asymétrique permettant la liaison entre le complexe des troponines et la tropomyosine (figure 4). Cependant, la TnT n'a pas qu'un simple rôle structural ; elle joue également un rôle modulateur au niveau de la régulation calcique de la contraction. Il existe ainsi une corrélation entre la composition en isoformes de TnT et la sensibilité calcique des fibres squelettiques et cardiaques (Reiser et al., 1992 ; Schachat et al., 1987). Elle module les interactions TnI-TnC, en réduisant l'affinité de la TnC pour la TnI (Cheung et al., 1987). La TnT peut également augmenter l'activité ATPasique de la myosine en présence de Ca^{2+} (Farah et al., 1994 ; Greaser & Gergely, 1971 ; Malnic & Reinach, 1994). Il existe plusieurs isoformes de TnT : la TnTf rapide (Breitbart & Nadal-Ginard, 1986), la TnTs lente (Gahlmann et al., 1987) et la TnTc cardiaque (Cooper & Ordahl, 1984).

2.3. Génération de force et mouvement.

2.3.1. Théorie de la contraction par glissement des filaments.

C'est Hugh Huxley qui, en 1954, propose la théorie de la contraction par glissement des filaments. Selon sa théorie, la contraction se fait par un glissement des filaments fins le long des filaments épais, de telle sorte que les filaments se chevauchent davantage.

Dans une fibre musculaire au repos, les filaments épais et minces ne se chevauchent que sur une partie de leur longueur, mais au cours de la contraction, les filaments minces pénètrent de plus en plus dans la région centrale de la bande A. Les bandes I sont ainsi raccourcies, les zones claires disparaissent (figure 5) et les bandes A de sarcomères adjacents se rapprochent les unes des autres. Au final, il apparaît un raccourcissement de la distance entre les deux stries Z successives mais la longueur des filaments d'actine et de myosine ne varie pas, uniquement leur degré de chevauchement.

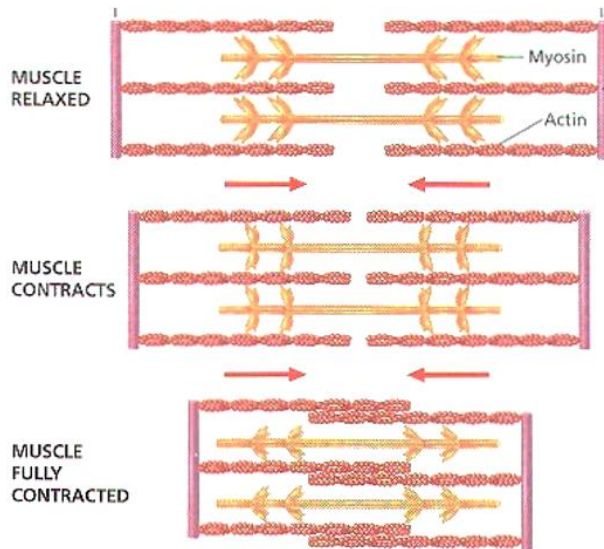


Figure 5 : Théorie de la contraction musculaire par glissement des filaments et raccourcissement du sarcomère.

2.3.2. Mécanisme de la contraction musculaire.

La théorie des filaments glissants est basée sur le coulisement des filaments fins et épais par des interactions cycliques entre l'actine et la myosine (Huxley, 1975 ; Huxley & Hanson, 1954). La force générée par les ponts acto-myosine est transmise longitudinalement et latéralement au sein de la fibre, et le mouvement a lieu lorsque la force parvient aux jonctions myotendineuses, aux tendons, pour aboutir enfin au déplacement des articulations. La force générée par le muscle dépend de différents facteurs, incluant le degré d'activation du muscle par le système nerveux, son architecture (tel que l'angle de pennation, correspondant à l'angle auquel les fibres vont s'insérer au niveau du tendon), la taille du muscle, l'espace entre les myofilaments, le nombre de ponts acto-myosine formés, et l'interaction entre l'actine et la myosine.

Le cycle attachement-détachement de la myosine (M) sur l'actine (A) comprend plusieurs étapes (figure 6), résultant de la génération d'une force lorsque de l'ATP est rendu disponible pour un pont acto-myosine. L'ATP se fixe au niveau d'une tête de myosine, résultant en un détachement de la myosine de l'actine, et donc la dissociation du pont acto-myosine. L'ATPase, dont l'activité est portée par la tête de myosine, va hydrolyser l'ATP, résultant en une molécule d'ADP et un phosphate inorganique (Pi) ; la tête de myosine va basculer et revenir à un angle de 90° puis se fixer au niveau d'une « nouvelle » molécule d'actine. Le relargage du Pi va déclencher la rotation de la tête de myosine à un angle de 45°, générant ainsi la force par coulisement des myofilaments ; l'ADP sera alors relargué de la tête de myosine (Geeves & Conibear, 1995 ; Gordon et al., 2000 ; Holmes, 1996 ; Kawai et al., 1987 ; Millar & Homsher, 1992 ; Pate & Cooke, 1989 ; Rayment & Holden, 1994) .

Le calcium joue un rôle fondamental dans la régulation de l'interaction actine-myosine et dans le processus contractile. Au repos, lorsque la concentration intracellulaire en ions calcium est faible, le filament de tropomyosine est positionné dans le sillon délimité par les deux filaments d'actine (figure 7) ; le complexe tropomyosine/troponines masque le site de fixation de la myosine à l'actine *via* la troponine I.

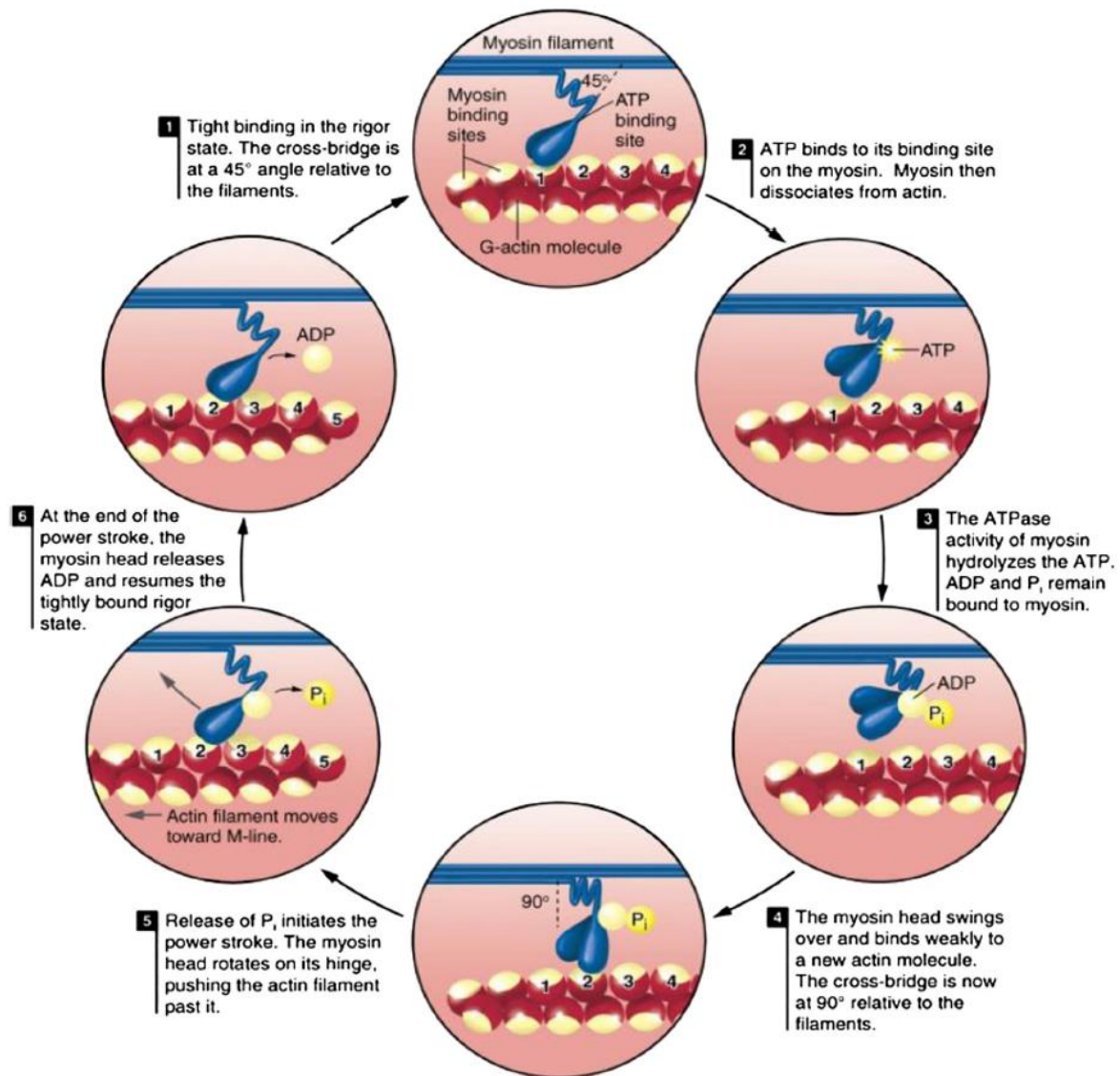


Figure 6 : Séquence des évènements conduisant à la génération d'une force et à la puissance. (d'après Frontera & Ochala, 2015).

2.3.3. Régulation calcique de la contraction musculaire.

La fixation d'ions calcium au niveau de la TnC renforce la liaison entre les trois sous-unités de troponines et initie le déplacement du filament de tropomyosine par l'intermédiaire de la TnT, conduisant à l'exposition des sites de fixation de la myosine sur l'actine. De plus, le complexe TnC-Ca²⁺ déplace la TnI de sa position inhibitrice sur l'actine en diminuant l'affinité de la TnI pour l'actine. Ainsi, la fixation de la tête de myosine sur l'actine peut se faire pleinement, et les cycles attachement/détachement de la myosine à l'actine vont pouvoir avoir lieu grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par cycle (Gordon et al., 2000).

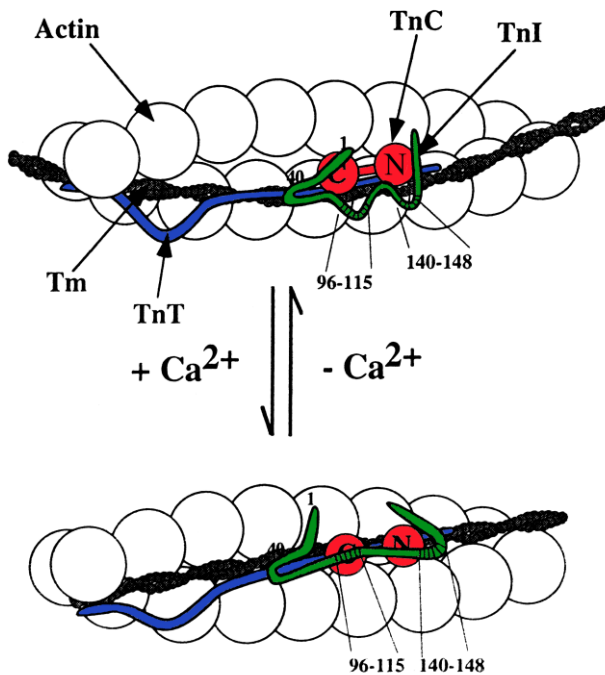


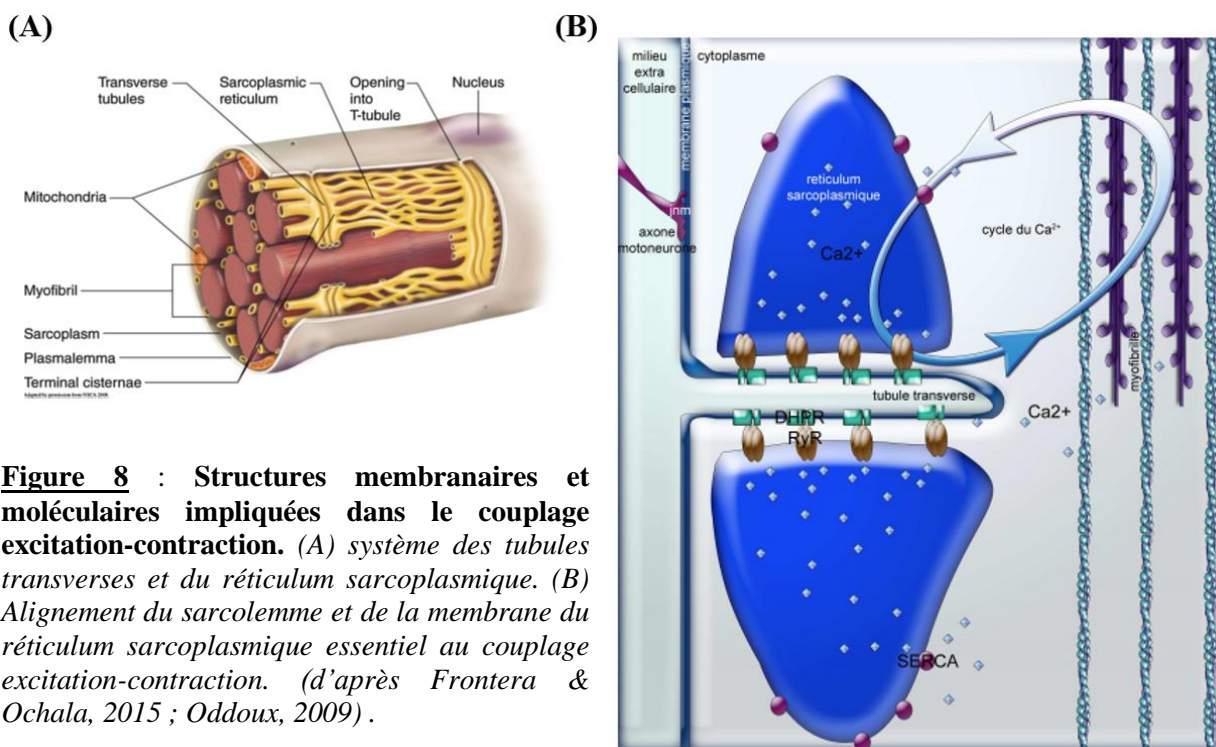
Figure 7 : Représentation schématique du filament fin d'actine, associé aux protéines régulatrices de la contraction musculaire en présence ou en l'absence de calcium. Localisation de la TnI (en vert) au sein du filament fin, en absence et en présence de calcium. La TnI interagit également avec la TnC (en rouge), et avec la TnT (en bleu). La présence de Ca^{2+} induit un changement de conformation du complexe des troponines, et un déplacement du filament de tropomyosine (en noir). (d'après Tripet et al., 1997).

2.4. Le couplage excitation-contraction.

Le couplage excitation-contraction est la coordination de deux processus indispensables à la génération d'une force : (i) la transmission du stimulus nerveux à une triade, suivie de la libération du calcium des citernes du réticulum sarcoplasmique, et (ii) l'interaction entre l'actine et la myosine permettant la formation des ponts acto-myosine. Il s'agit de la succession d'événements par lesquels le potentiel d'action transmis le long du sarcolemme provoque le glissement des myofilaments, ce qui correspond à la transformation d'un signal électrique en un travail mécanique. C'est pendant ce laps de temps entre le début du potentiel d'action et le début de l'activité musculaire (temps de latence) que se déroulent les événements constituant le couplage excitation-contraction. De nombreuses protéines et interactions protéiques jouent un rôle fondamental dans la régulation calcique de la contraction et dans le couplage excitation-contraction ; il s'agit en particulier du récepteur aux dihydropyridines (DHPR), du récepteur à la ryanodine ou canal calcique du réticulum sarcoplasmique (RyR), des protéines régulatrices de la contraction musculaire ou troponines (Tn), de la tropomyosine (Tm), des chaînes lourdes (MHC) et des chaînes légères (MLC) de myosine, de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA), et de la calsequestrine qui lie le Ca^{2+} dans la lumière du RS.

Le couplage excitation-contraction débute avec l'arrivée du potentiel d'action au niveau de la membrane de la fibre musculaire, la dépolarisation induite au niveau de la jonction neuromusculaire se propageant le long du sarcolemme. Elle est conduite vers l'intérieur de la fibre par le système des tubules transverses (tubules T), correspondant à des invaginations du sarcolemme (figure 8A). L'influx nerveux arrive au niveau de la triade où le tubule T est à proximité de la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique, qui stocke le calcium. Une sous-unité sensible à la variation de potentiel du DHPR des tubules T va changer de conformation, ce qui va induire l'ouverture par couplage physique direct du RyR,

localisé au niveau de la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique et faisant face au DHPR. L'ouverture du RyR va conduire à la libération d'une grande quantité d'ions calcium dans le sarcoplasme. Ces interactions entre le DHPR, localisé dans la membrane du système tubule transverse, et le RyR, sont donc à la base du processus de couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique et cardiaque : le DHPR est le détecteur de voltage (voltage sensor) du couplage excitation-contraction, informant le RyR de l'existence d'une dépolarisation de la membrane tubulaire (figure 8B). Le calcium libéré dans le sarcoplasme va se fixer sur la TnC au niveau des filaments fins, ce qui va initier les événements moléculaires déplaçant les filaments de tropomyosine qui bloquaient les sites de fixation de la myosine sur l'actine (Rebeck et al., 2014). L'activation du système régulateur de l'appareil contractile entraîne donc la formation des ponts actine-myosine ; après dissociation du Ca^{2+} de la TnC, les ions Ca^{2+} seront recaptés dans le réticulum sarcoplasmique grâce à l'action de la pompe SERCA, localisée dans toute la membrane longitudinale de la citerne terminale du RS sauf dans la partie jonctionnelle, face au tubule-T.



3. La cytoarchitecture sarcomérique.

Tandis que le mécanisme de la contraction musculaire détaillé dans le paragraphe précédent est lié aux filaments épais de myosine et aux filaments fins d'actine (ainsi que les protéines régulatrices tropomyosine et troponines), d'autres protéines du sarcomère vont être impliquées dans la transformation de l'énergie chimique en énergie cinétique (Au, 2004). Ces protéines vont être impliquées dans la régulation de nombreux aspects de la fonction musculaire, notamment la régulation de la contraction, la création d'un véritable « échafaudage » pour l'ancrage de l'actine et de la myosine, le maintien de la stabilité du sarcomère, ou encore le contrôle de la myofibrillogénèse (figure 9).

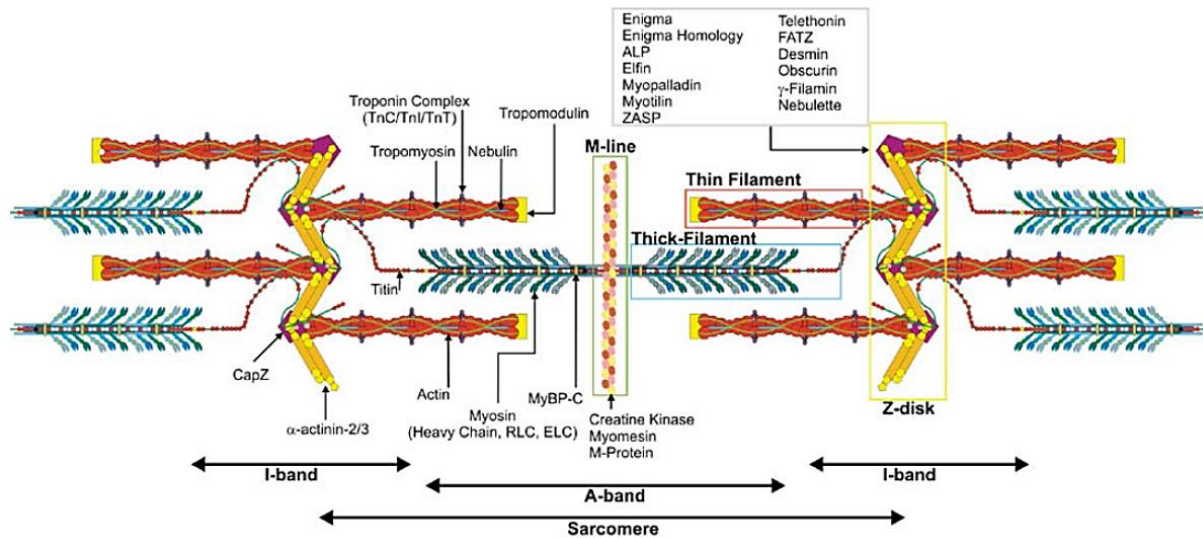


Figure 9 : Protéines constitutives des myofilaments du sarcomère. (d'après Au, 2004).

Nous allons voir ci-après les principales protéines constitutives du sarcomère. Des mutations de l'une ou l'autre de ces protéines sont à l'origine de nombreuses maladies musculaires, présentant une sévérité variable selon les pathologies, d'une paralysie dès la naissance à une sévérité moindre permettant au patient de mener une vie normale (Laing & Nowak, 2005 ; Tajsharghi, 2008).

3.1. Autres protéines constitutives du sarcomère.

3.1.1. Au niveau du filament fin.

Au niveau du filament fin, outre l'actine, protéine motrice, et les protéines régulatrices de la contraction musculaires (tropomyosine et complexe des troponines), d'autres protéines vont participer à l'organisation structurale du filament fin. Parmi elles, la nébuline (figure 10) est une protéine de très haut poids moléculaire (entre 500 et 900 kDa), permettant de contrôler la longueur du filament fin.

La nébuline. Cette protéine forme une structure fibreuse permettant l'assemblage linéaire du filament fin. Elle est ancrée par sa région C-terminale au disque Z, tandis que son extrémité N-terminal est localisée à la fin du filament fin formant la bande I. De manière plus spécifique, la nébuline s'associe aux protéines CapZ et tropomoduline, qui bloque les extrémités du filament à la strie Z et à l'extrémité de la bande I (Au, 2004 ; Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009). Comme on peut le visualiser sur la figure 10, la nébuline possède de multiples partenaires protéiques ; on peut noter que le domaine SH3, localisé au niveau du domaine C-terminal, interagit avec le domaine PEVK de la titine (les motifs PEVK agissant comme un ressort, jouant donc un rôle dans la régulation de la fermeté et de l'élasticité des fibres musculaires), ainsi que la myopalladine (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009).

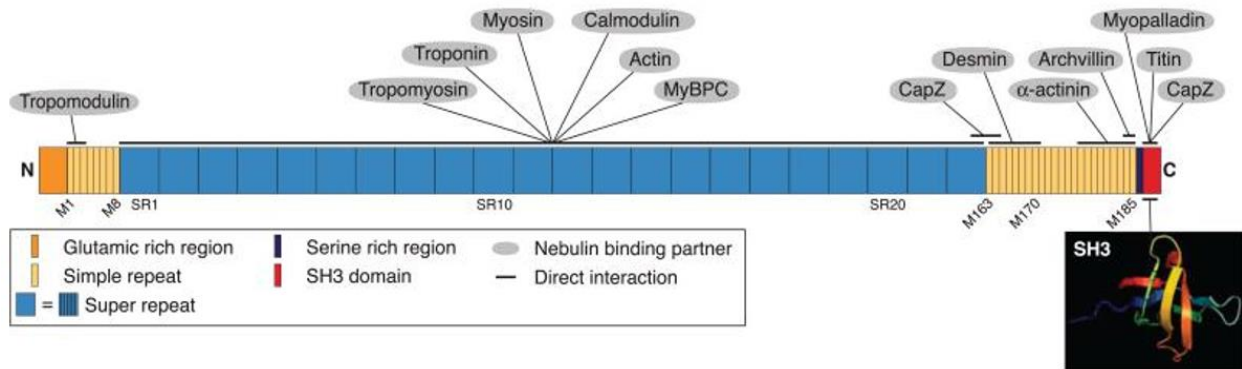


Figure 10 : Représentation schématique de la nébuline, illustrant son orientation, sa structure et ses protéines partenaires. Les motifs M1-M185 sont des motifs répétitifs d'environ 35 acides aminés ; le domaine central est constitué de domaines SR « super-repeat », chacun étant constitué de 7 modules. Les domaines N- et C-terminaux interagissent avec des protéines recouvrant les extrémités du filament fin, et sont localisés à l'extrémité de la bande I et à la strie Z respectivement. (d'après Kontogianni-Konstantopoulos et al., 2009).

Les protéines de « coiffe » du filament fin. La protéine CapZ est localisée au disque Z du sarcomère où son principal rôle est l'assemblage de l'actine ; en se fixant à l'extrémité des filaments d'actine, la CapZ régule l'addition ou l'élimination de monomères d'actine. Elle interagit aussi avec l' α -actinine pour orienter les filaments d'actine (Au, 2004). La tropomoduline est quant à elle une protéine se fixant à la fin du filament d'actine, à l'extrémité de la bande I (figure 9) ; elle coiffe l'extrémité des filaments d'actine afin d'en maintenir la longueur *in vivo*. Elle possède une affinité l'actine, augmentée en présence de tropomyosine, ce qui lui confère une plus forte spécificité pour l'actine filamentaire plutôt que pour l'actine monomérique (Weber et al., 1999).

3.1.2. Au niveau du filament épais.

Le composant principal des filaments épais est la myosine, dont nous avons vu la structure dans un paragraphe précédent (paragraphe 2.1. « Protéines constitutives du filament épais de myosine. »). Des composants additionnels vont constituer les filaments épais, notamment les MyBP-C et MyBP-H (Myosin binding protein C and H). L'épaisseur du filament épais est principalement régulée par la MyBP-C. Elle est exprimée exclusivement dans les muscles striés, sous forme de trois isoformes distinctes : une isoforme lente (aussi connue sous le nom de MyBP-X), une isoforme rapide et une isoforme cardiaque. Elle est constituée d'une multitude de domaine fibronectine et immunoglobuline, comme la titine (voir ci-après).

La titine. La titine ou connectine est la plus grande protéine décrite jusqu'à aujourd'hui (masse moléculaire de 3 MDa), et c'est la troisième protéine du muscle squelettique en termes d'abondance (Fukuda et al., 2008 ; Maruyama et al., 1981). Chaque molécule de titine atteint une longueur de 1 μm , et elle peut atteindre une longueur de 2-2.5 μm *in vitro* (Au, 2004). La titine s'étant sur la moitié de la longueur du sarcomère, s'ancrant à la strie Z par son extrémité

N-terminale, tandis que l'extrémité C-terminale est localisée à la bande M. Sa fonction principale est de maintenir l'alignement des sarcomères pendant la contraction, et est responsable des propriétés d'élasticité musculaire (Labeit et al., 1997 ; Meyer & Wright, 2013). Elle permet de positionner les filaments de myosine au centre du sarcomère, et régule l'assemblage et la longueur du filament épais (Whiting et al., 1989). Différentes sections de la titine présentent des fonctions spécifiques. Ainsi, la section de la titine située au niveau de la bande I agissent comme une connexion élastique entre la strie Z et les filaments épais, la section de la région de la bande A est associée à la myosine et à d'autres constituants du filament épais, tandis que la section localisée au niveau de la ligne M fait partie intégrante du réseau de la bande M. La titine a longtemps été considérée uniquement comme une protéine d'échafaudage, servant d'empreinte pour la sarcomérogénèse et l'assemblage des protéines myofibrillaires (Ehler & Gautel, 2008 ; Tskhovrebova & Trinick, 2010).

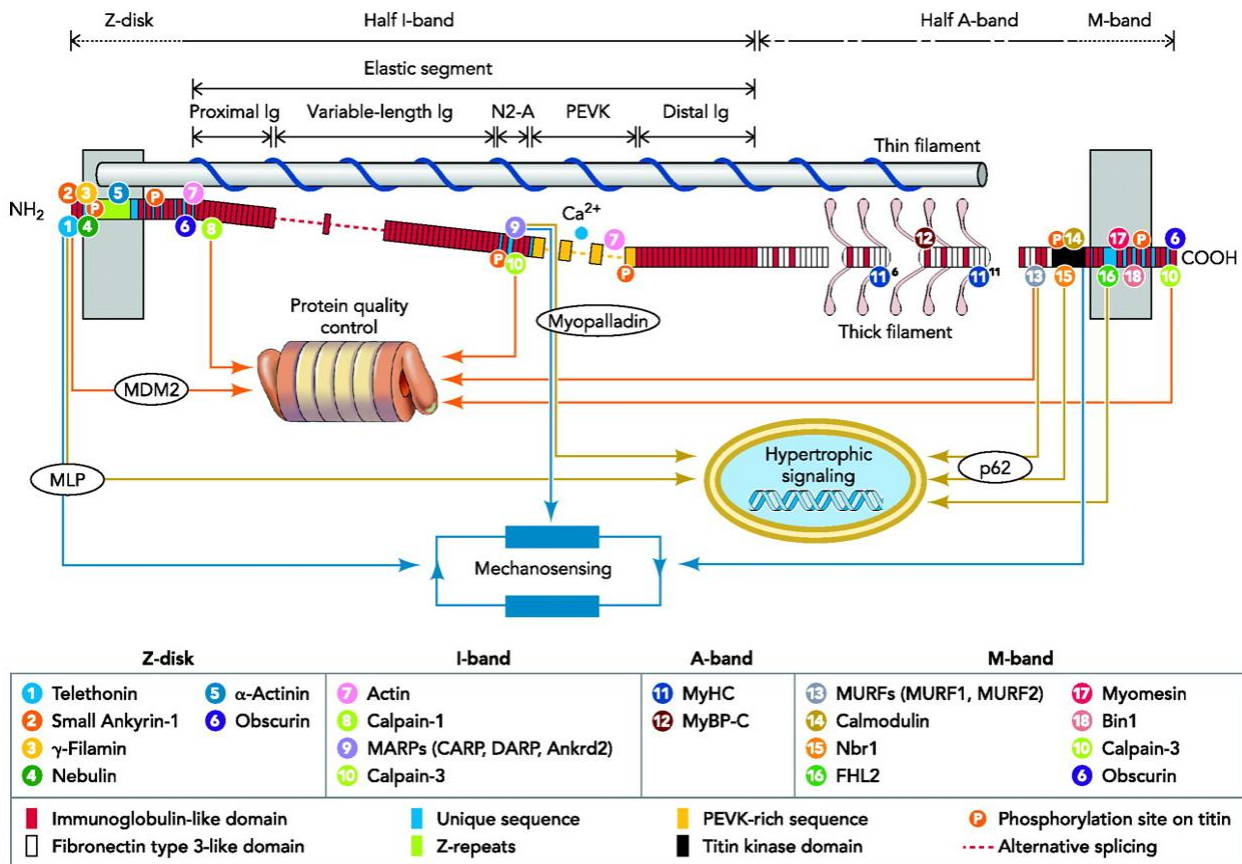


Figure 11: Architecture des domaines de la titine dans le muscle strié, s'étendant sur la moitié d'un sarcomère, ainsi que ses différents ligands et les principales voies de signalisation impliquant la titine. Notez l'implication de la titine dans les signaux hypertrophiques, la mécano-transduction et le contrôle de la qualité des protéines (notamment leur turn-over vis-à-vis des processus de dégradation protéique). (d'après Linke & Kruger, 2010).

Outre son rôle structural et son implication dans les propriétés d'élasticité du muscle strié, la titine joue un rôle central dans la transmission des signaux hypertrophiques du muscle squelettique, et dans le « contrôle qualité » des protéines sarcomériques. En effet, des petites

protéines de choc thermique (α B-cristalline et HSP27) sont fixées au niveau de la partie « ressort » de la titine, et des protéines impliquées dans les systèmes de dégradation sont également associées à la titine. En particulier, des calpaïnes interagissent au niveau du domaine N-terminal de la bande I ou de la bande M (pour les calpaïnes 1 et 3 respectivement), et des E3-ubiquitine ligases (MURF1 et MURF2) sont localisées au niveau de la bande M (Kotter et al., 2014a ; Kruger & Linke, 2011 ; Linke & Kruger, 2010).

3.1.3. Au niveau de la strie Z et de la ligne M.

Un composant essentiel du sarcomère est un complexe multiprotéique appelée disque Z (ou strie Z). La strie Z permet le maintien de l'organisation sarcomérique et la transmission de force. Le composant majeur de la strie Z est l' α -actinine, qui interagit avec les filaments fins au niveau de la ligne Z (figure 9). La principale fonction de l' α -actinine est de servir de point d'ancrage à de multiples protéines, en particulier l'actine, mais aussi la titine et des membres de la famille enigma telles que ZASP/Cypher/Oracle. D'autres protéines sont également localisées au niveau de la strie Z, parmi lesquelles la myotiline, la myopalladine, la desmine, l'obscurine, la téléthonine... (Clark et al., 2002 ; Sanger & Sanger, 2008).

La ligne M a une fonction similaire à la strie Z dans le sens où elle confère la stabilité au sarcomère. Il s'agit d'une structure protéique très dense localisée au centre de la bande A, indispensable au maintien de l'alignement des filaments épais, et participant à la répartition du stress mécanique à travers la sarcomère lors de la contraction (Hu et al., 2015). Il n'y a pas de tête de myosine au niveau de la bande M, et la polarité des filaments change à ce niveau. Elle permet la liaison des filaments de myosine selon un réseau hexagonal grâce à des ponts M. D'autres protéines sont liées au niveau de la bande M, incluant la titine, la myosine, le myoméline, la protéine M, des enzymes glycolytiques... Au niveau de la ligne M sont également associées la créatine kinase M et l'adénylate kinase, permettant de régénérer l'ATP selon les demandes métaboliques émanant des myofibrilles, notamment lors de la contraction musculaire (Au, 2004 ; Hu et al., 2015).

3.2. Les filaments intermédiaires.

Les muscles striés sont très fortement organisés, ce qui permet une signalisation mécano-chimique efficace entre l'appareil contractile et le noyau ou d'autres organelles. Le maintien d'un tel niveau d'intégration nécessite un système ayant la capacité d'interagir avec toutes les structures impliquées : les filaments intermédiaires jouent ce rôle essentiel à la fonction du muscle strié, en permettant le lien entre l'appareil contractile et les mitochondries, les noyaux, ainsi que le sarcolemme (Capetanaki et al., 2007 ; Clark et al., 2002). Au niveau structural, les filaments intermédiaires sont constitués d'une tige centrale, en hélice α , flanquée d'une tête N-terminale et d'une queue C-terminale. Dans le muscle squelettique, la desmine est la principale protéine des filaments intermédiaires, et elle est un composant clé de la strie Z, des costamères, ou encore de la jonction myotendineuse. Les filaments de desmine interconnectent latéralement les myofibrilles par les stries Z, et associent les myofibrilles avec le sarcolemme, les noyaux, les mitochondries et les microtubules (figure 12).

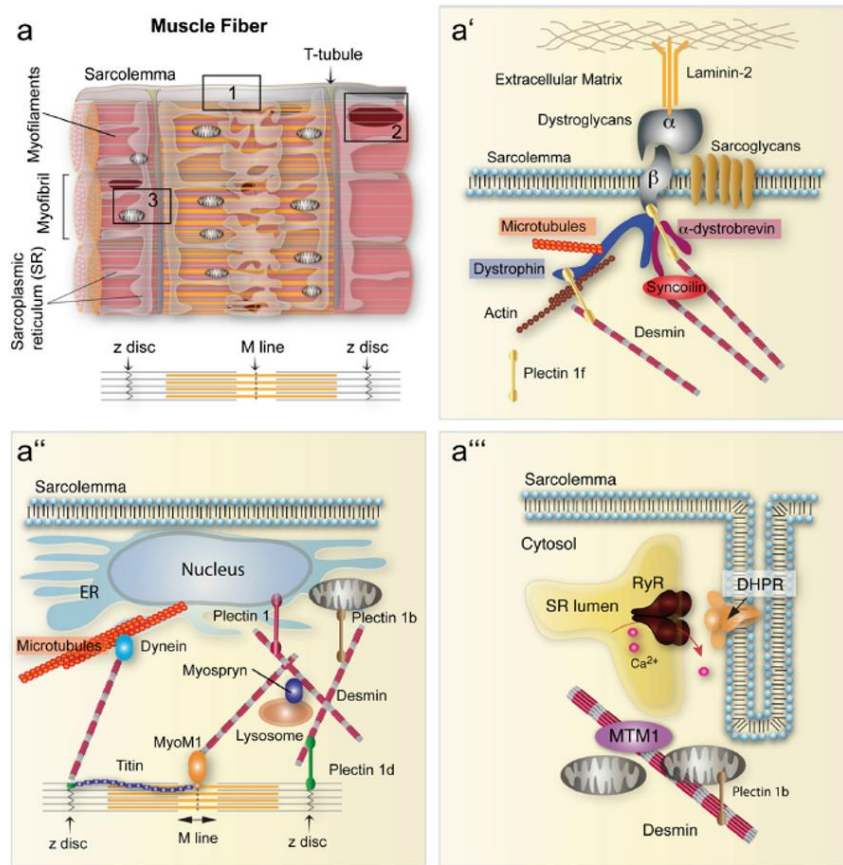


Figure 12 : Les filaments intermédiaires de desmine , véritables « organisateurs » cellulaires. (a) Organisation de la fibre musculaire représentant les myofibrilles compactées, entourées du réticulum sarcoplasmique. (a') Association des filaments de desmine avec les costamères, permettant l'ancrage des myofibrilles à la membrane. (a'') Réseau de desmine connectant les noyaux aux autres organelles. (a''') Lien possible entre la desmine et le réticulum sarcoplasmique. (d'après Hnia et al., 2015).

3.3. Interactome structural et sa régulation.

Le muscle strié est une machinerie précise, efficace, et extrêmement complexe ; sa contraction génère une force transmise par l'intermédiaire de réseaux cytosquelettiques interconnectés (Clark et al., 2002). Le sarcomère, unité fonctionnelle du muscle strié, résulte d'un strict assemblage macromoléculaire, extrêmement complexe, nécessitant une localisation précise et régulée des protéines constitutives, formant un réseau que l'on peut qualifier de semi-cristallin (figure 13, Squire et al., 2005).

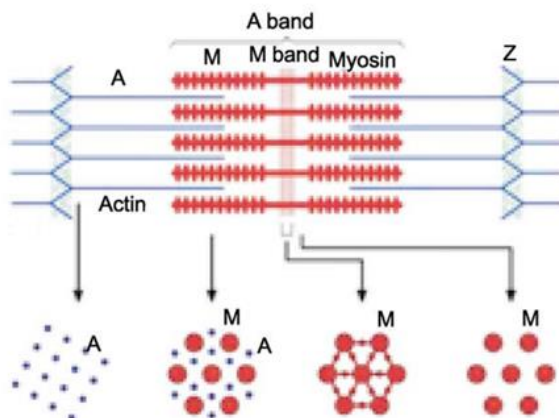


Figure 13 : Structure sarcomérique s'étendant entre deux stries Z successives. Notez l'organisation semi-cristalline de ces filaments épais de myosine (M) et d'actine (A). (d'après Squire et al., 2005).

Tandis que les filaments fins et épais interagissent pour générer la force de contraction, d'autres protéines constituent un réseau complexe et interconnecté, appelé « cytosquelette sarcomérique », dont le rôle est de réguler la fonction sarcomérique pour permettre son travail efficace (Gautel, 2011). Ce réseau complexe va ainsi assurer la modulation des interactions acto-myosine, la transmission optimale de la force générée, et le parfait maintien de l'architecture régulière du sarcomère. Cette structure semi-cristalline (Lodish et al., 2005) est dynamique, alliant des changements coordonnés dans la synthèse et la dégradation protéiques (Boonyarom & Inui, 2006), ainsi que dans l'assemblage et le maintien du cytosquelette sarcomérique (Clark et al., 2002). Ce dynamisme va être modulé par des interactions protéine-protéine, en particulier au niveau de deux points nodaux : la ligne M (figure 14A) et la strie Z (figure 14B).

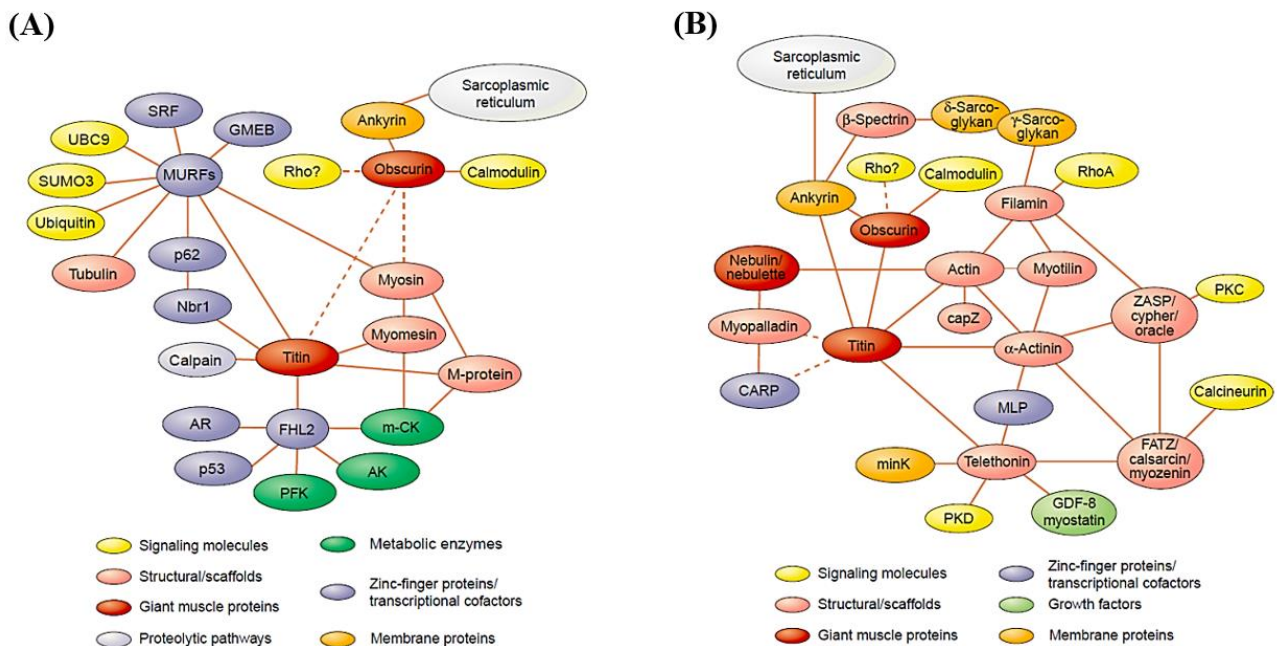


Figure 14 : Interactomes des principales protéines présentes au niveau de la ligne M (A) et de la strie Z (B) dans le sarcomère du muscle strié squelettique. (d'après Lange et al., 2006).

La ligne M a un rôle stabilisateur en maintenant constant l'écart entre les myofilaments de myosine, et en les liant entre eux de façon parallèle (ex : myoméline, protéine M,...). Quant à la strie Z, elle correspond à une zone d'ancrage et de structuration des myofilaments d'actine, et de leur maintien via de nombreuses protéines structurales associées (ex : BAG3, ZASP, myotiline, filamine C, alpha-B-cristalline, alpha-actinine, ...). De nombreuses protéines des filaments intermédiaires, telles que la desmine, vont également être impliquées dans la structuration du sarcomère. La desmine va notamment s'insérer au niveau de la strie Z pour lier les myofibrilles entre elles, mais aussi à la membrane plasmique et aux organites (Olive et al., 2007). Cette protéine va véritablement former un réseau permettant de structurer le sarcomère et la myofibrille au sein de la cellule (Paulin & Li, 2004). 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 sont également localisées au niveau de ces structures (figure 14), et sont essentielles à l'équilibre synthèse/dégradation des protéines myofilamentaires (Bonaldo & Sandri, 2013 ; Boonyarom & Inui, 2006 ; Knoll et al., 2011).

Des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, sont impliquées dans la formation et le maintien de cet interactome structural, comme cela a été démontré pour la téléthonine (Sadikot et al., 2010), la myoméline (Obermann et al., 1997 ; Tskhovrebova & Trinick, 2003), ou encore la desmine (Huang et al., 2002). De manière intéressante, un défaut du processus de phosphorylation de la desmine a été mis en évidence dans le désassemblage des filaments de desmine dans des cardiomyopathies (Huang et al., 2002). Par ailleurs, la phosphorylation a un rôle dans l'assemblage et la stabilisation de certaines protéines telles que l'actine (*via* la phosphorylation de la caldesmone) (Hai & Gu, 2006) ou la desmine (Huang et al., 2002).

Il est à noter que cette structuration est fortement remodelée, voire désassemblée, dans certaines pathologies neuromusculaires, telles que les myopathies myofibrillaires (Schroder & Schoser, 2009 ; Selcen, 2011). Ces pathologies résultent en grande partie de la mutation de protéines structurales (desmine, α B-cristalline, myotiline, ZASP, filamine C, et BAG3), entraînant un défaut de formation des filaments par la perte des processus de polymérisation ou d'interactions protéine-protéine.

4. Polymorphisme des fibres musculaires et plasticité musculaire.

4.1. Hétérogénéité du tissu musculaire : les différents types de fibres.

L'hétérogénéité des muscles squelettiques est liée à une très grande variabilité des propriétés mécaniques, biochimique et métabolique des fibres individuelles ; les propriétés des muscles vont résulter de la prédominance de l'un ou l'autre des différents types de fibres. Les muscles de l'organisme sont ainsi constitués d'un mélange des différents types de fibres, ce qui leur confère une certaine vitesse de contraction et une certaine résistance à la fatigue. L'hétérogénéité des fibres composant un muscle sera à l'origine de sa spécificité physiologique. Ainsi, un muscle postural, permettant le maintien en position assise ou debout, est constitué essentiellement de fibres lentes de type I (dont les propriétés seront définies ci-après ; figure 15), tandis que les muscles impliqués dans le mouvement sont principalement constitués de fibres rapides de type II. Les fibres musculaires sont classées selon différents critères incluant : (i) la coloration des fibres (rouge *vs* blanche), en corrélation avec le contenu en myoglobine ; (ii) les propriétés contractiles des unités motrices (l'unité motrice étant la plus petite unité fonctionnelle du muscle, constituée par un motoneurone α , et les fibres musculaires qu'il innerve) en réponse à la stimulation électrique ; (iii) la vitesse de raccourcissement lors d'une secousse simple (lente *vs* rapide) ; (iv) le degré de fatigabilité lors d'une activation soutenue (fatigable *vs* résistante à la fatigue) ; (v) la prédominance de voies enzymatiques ou métaboliques (métabolisme oxydatif *vs* glycolytique), en lien avec le nombre de mitochondries que contient la fibre ; (vi) l'activité de la myosine ATPase ; (vii) la réponse calcique du réticulum sarcoplasmique (lente *vs* rapide) ; et enfin (viii) l'expression

des isoformes de protéines contractiles et régulatrices (Galpin et al., 2012 ; Schiaffino & Reggiani, 2011).

La classification la plus couramment utilisée définit trois types de fibres : le type I (fibre lente, oxydative, résistante à la fatigue), le type IIA (fibre rapide, aux propriétés métaboliques intermédiaires), et le type IIX/IIB (fibre rapide, glycolytique, fatigable) (figure 15).

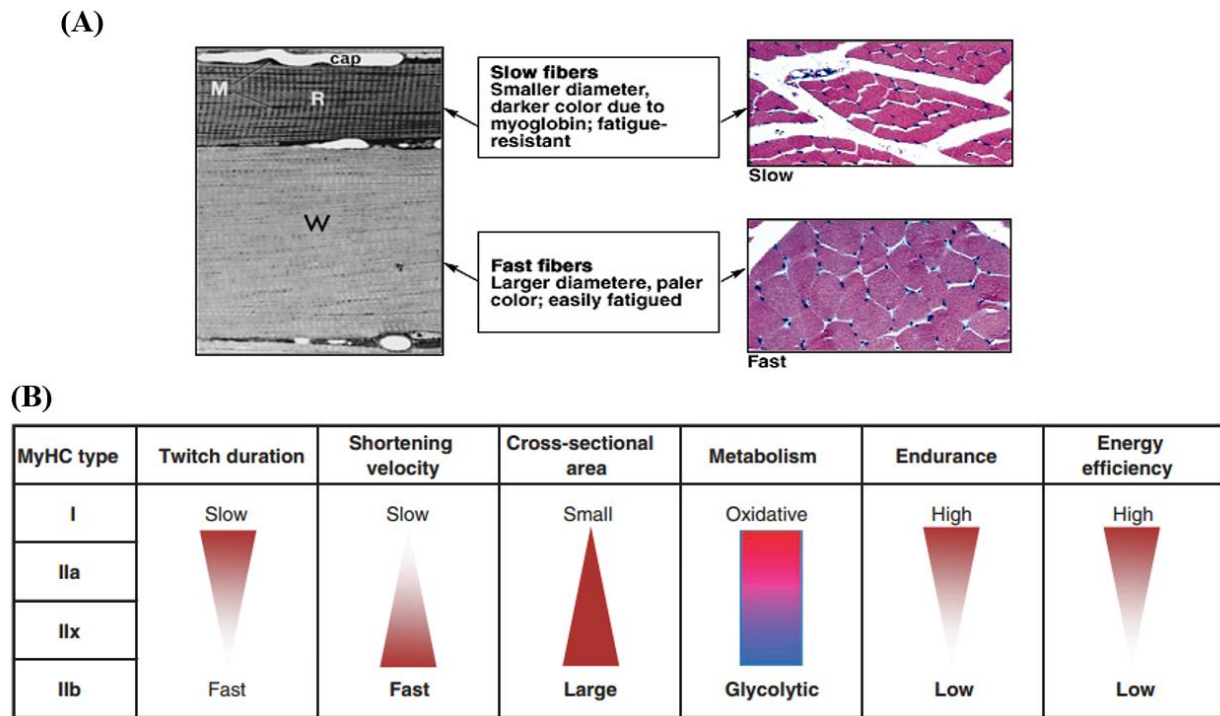


Figure 15 : Les différents types de fibres musculaires. (A) Coupes histologiques de muscle squelettique permettant de mettre en évidence les deux types de fibres musculaires, lentes et rapides. (B) Propriétés des différents types de fibres musculaires de mammifères (d'après Gundersen, 2011).

4.2. Expression des protéines myofibrillaires selon le type de fibre.

Il existe un haut degré de variabilité moléculaire au sein du sarcomère, due à l'existence de multiples isoformes de chaque composant myofibrillaire. Les fibres lentes expriment les isoformes lentes des protéines contractiles et régulatrices, et les fibres rapides les isoformes rapides. Les isoformes des protéines myofibrillaires sont donc spécifiques du type et de la fonction de la fibre, et peuvent être utilisées comme marqueurs pour les différents types de fibres dans le muscle squelettique.

Outre les fibres musculaires purement rapides et les fibres musculaires purement lentes, il existe des fibres dites hybrides selon l'hétérogénéité des protéines contractiles qu'elles expriment, en particulier les MHC. Ainsi, on a longtemps distingué les fibres pures (exprimant soit de la MHC-I lente, soit de la MHC-II rapide) des fibres hybrides (coexprimant des isoformes rapides et lentes de MHC) (Pette & Staron, 1990). En réalité, il existe aujourd'hui de nombreuses données qui montrent que les fibres musculaires présentent des patterns d'expression hétérogènes pour de nombreuses autres protéines que les MHC. Ainsi il

a été démontré que des fibres musculaires pouvaient exprimer exclusivement une isoforme lente de MHC, mais à la fois des isoformes lentes et rapides de MLC (Bortolotto et al., 2000 ; Mizusawa et al., 1982 ; Stevens et al., 2004). Sur la base de leur composition en MHC, ces fibres pourraient donc être considérées comme purement lentes, alors qu'elles sont hybrides et présentent une hétérogénéité pour d'autres protéines contractiles. Il existe d'autre part une hétérogénéité en fonction de l'expression des protéines régulatrices ; ainsi, on peut avoir une expression de MHC-I accompagnée de l'expression d'isoformes lentes et rapides de protéines régulatrices (Bastide et al., 2002 ; Kischel et al., 2005).

Les fibres lentes et rapides peuvent également être différenciées en considérant l'expression des enzymes du métabolisme énergétique, en particulier des enzymes de l'activité oxydative ou de l'activité glycolytique (Fitts et al., 1989 ; Pette & Staron, 1990). Enfin, un certain nombre de protéines participant à la régulation de l'homéostasie calcique sont également exprimées différenciellement (Bastide et al., 2000 ; Conti et al., 1996 ; Huber & Pette, 1996 ; Leberer & Pette, 1986 ; MacLennan et al., 1997).

4.3. Transition entre les différents types de fibres musculaires : la plasticité musculaire

4.3.1. Le muscle, une structure plastique.

Le muscle est une structure capable de s'adapter à des changements de l'environnement physiologique ou physique grâce à une plasticité qui peut affecter l'ensemble de ses composantes. Ainsi, les fibres musculaires sont des structures dynamiques ; leur composition moléculaire et leurs propriétés contractiles peuvent se modifier sous l'influence de différents facteurs tels que l'âge, l'innervation, les facteurs de croissance, les hormones, l'activité neuromusculaire et la charge mécanique imposée. Cette plasticité s'observe en différentes circonstances (développement, vieillissement, maladies neuromusculaire, exercice, inactivité physique, immobilisation...). La plasticité concerne le phénotype musculaire (on pourra observer la transition d'un muscle lent en un muscle rapide par exemple), mais aussi la masse musculaire (atrophie musculaire vs hypertrophie).

L'atrophie fonctionnelle dans laquelle un muscle de phénotype lent acquiert un phénotype rapide peut être induite par un modèle expérimental chez le rongeur (Morey et al., 1979 ; Musacchia & Deavers, 1980), dans lequel le train arrière du rat est surélevé par la queue ou par un harnais abdominal. L'animal peut se déplacer grâce à ses membres antérieurs, et avoir ainsi librement accès à l'eau et à la nourriture. Dans ces conditions, le système musculo-squelettique des membres postérieurs se trouve en hypodynamie (absence de charge corporelle), et en hypokinésie (réduction des activités motrices), d'où la dénomination d'hypodynamie-hypokinésie (HH). Cette plasticité se traduit par une transition phénotypique du muscle lent en un muscle rapide, tant au niveau des propriétés contractiles que des propriétés métaboliques, et l'atrophie résultante s'accompagne d'une diminution de la force musculaire.

4.3.2. Plasticité des fibres musculaires squelettiques dans le modèle d'hypodynamie-hypokinésie.

L'atrophie et la perte de fonction musculaires sont fréquemment rencontrées dans certaines pathologies musculaires. Ce sont également des problèmes sérieux consécutifs lors du vieillissement, de l'inactivité physique, de l'immobilisation, ou résulter d'autres pathologies telles que le cancer ou l'insuffisance cardiaque...

Les causes de la réduction du travail musculaire pourraient impliquer des processus affectant l'étendue et la fréquence d'activation de l'unité motrice, la transmission synaptique neuromusculaire, le couplage excitation-contraction, ainsi que le mécanisme intime de la contraction musculaire faisant intervenir les protéines myofibrillaires (McDonald et al., 1994). Les effets de l'HH sont variés ; tout d'abord, elle conduit à une diminution de la masse du muscle, particulièrement marquée pour les muscles antigravitaires tels que le soléaire (Staron et al., 1998), s'accompagnant d'une diminution du contenu en protéines myofibrillaires de l'ordre de 50% (McDonald & Fitts, 1995). Cette atrophie est due à la diminution de la section des fibres et non à la diminution du nombre de fibres (Templeton et al., 1988), et elle est associée à une diminution de la concentration en protéines totales liée à une augmentation du taux de dégradation et une diminution de la synthèse protéiques (Edgerton & Roy, 1991 ; Goldspink et al., 1986 ; Steffen & Musacchia, 1985 ; Thomason et al., 1989).

On note également une diminution de la sensibilité calcique, en partie liée à l'expression d'isoformes rapides de protéines contractiles (MHC) et régulatrices (TnT, TnI et TnC) de la contraction dans les fibres atrophiées (Bastide et al., 2002 ; Stevens et al., 1993 ; Stevens et al., 2002), ainsi que des protéines du réticulum sarcoplasmique comme le RyR (Bastide et al., 2000). Le muscle soléaire, lent, se transforme en un muscle rapide ; cette transformation d'un phénotype lent en un phénotype rapide est caractérisée par une augmentation de la proportion des fibres de type II au détriment des fibres de type I (Stevens et al., 1999).

Les propriétés métaboliques sont également changées (Desplanches, 1997). Le soléaire va acquérir les caractéristiques d'un métabolisme de type glycolytique, typique des fibres rapides (Fitts et al., 1989) ; le potentiel oxydatif des fibres atrophiées n'est cependant pas modifié (Desplanches et al., 1991 ; Manchester et al., 1990). En conséquence, les muscles lents vont présenter une plus grande susceptibilité à la fatigue musculaire (Baldwin et al., 1993 ; Caiozzo et al., 1994).

Seconde partie

La O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation

Seconde partie : la O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation

1. La O-GlcNAcylation, une glycosylation atypique...

1.1. Mécanisme général du processus de O-GlcNAcylation.

La O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation, ou O-GlcNAcylation, est une glycosylation atypique dans le sens où elle correspond au transfert d'un unique monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine par l'intermédiaire d'une liaison β sur le groupement hydroxylé de résidus de sérine et de thréonine d'une protéine (figure 16).

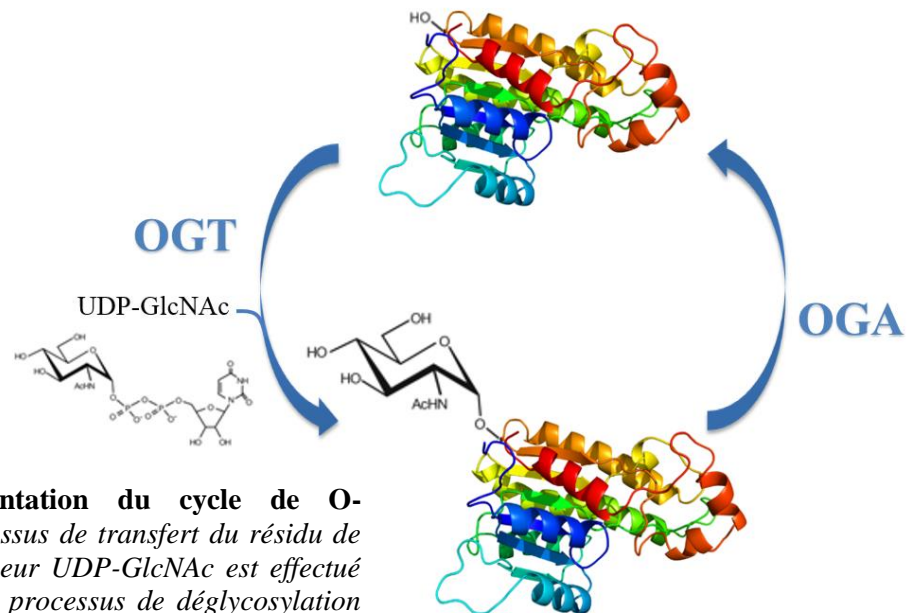


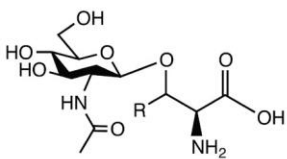
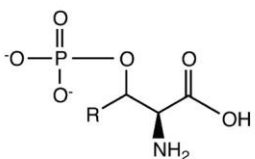
Figure 16 : Représentation du cycle de O-GlcNAcylation. Le processus de transfert du résidu de GlcNAc à partir du donneur UDP-GlcNAc est effectué par l'OGT, tandis que le processus de déglycosylation est effectué par l'OGA. Notez la similitude avec le processus de phosphorylation/déphosphorylation.

La découverte de la O-GlcNAcylation par Gerald W.Hart en 1984 (Torres & Hart, 1984) a révolutionné le monde de la glycobiochimie car elle a remis en question le dogme selon lequel les glycoprotéines correspondaient à des protéines membranaires ou sécrétées, modifiées par des structures glycaniques complexes. En effet, la O-GlcNAcylation se distingue des autres glycoprotéines à plusieurs égards : (i) elle modifie exclusivement des protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales ; (ii) le résidu de GlcNAc n'est pas modifié par l'ajout d'autres monosaccharides ; (iii) cette glycosylation est dynamique et réversible, si bien que le motif O-GlcNAc peut être ajouté ou enlevé plusieurs fois tout au long de la vie d'une protéine (Hart & Akimoto, 2009).

En ce sens, la O-GlcNAcylation est beaucoup plus proche de la phosphorylation qu'elle ne l'est des glycosylations « classiques ». La modification des protéines par la O-GlcNAcylation a d'ailleurs très rapidement émergé comme un mécanisme cellulaire majeur

capable de rivaliser avec la phosphorylation en termes de protéines modifiées et d'importance pour la physiologie cellulaire. La O-GlcNAcylation présente des similitudes avec la phosphorylation (tableau I ; Bond & Hanover, 2015), en particulier le dynamisme du processus, ces deux modifications post-traductionnelles ayant un turn-over beaucoup plus rapide que la durée de vie de la protéine modifiée. Les sites modifiés par la O-GlcNAcylation correspondent à des résidus de sérine ou de thréonine qui peuvent également être touchés par la phosphorylation. Un couple d'enzymes antagonistes (OGT/OGA) est impliqué dans le processus de O-GlcNAcylation, tout comme les couples kinases/phosphatases. Malgré ce parallèle entre les deux modifications post-traductionnelles, il est possible de relever un certain nombre de différences (tableau I), telles que le donneur de la modification, mais également la charge du groupement transféré sur la protéine acceptrice. En effet, le groupement phosphate permet l'ajout d'une charge négative au niveau de la protéine, tandis que la O-GlcNAcylation est l'attachement d'une hexosamine acétylée non chargée. Enfin, contrairement au couple unique OGT/OGA, il existe une multitude de kinases et de phosphatases impliquées dans la phosphorylation des protéines. De plus, les kinases présentent également une séquence consensus bien définie, facilement prédictible à partir de la séquence primaire d'une protéine, contrairement à l'OGT pour laquelle il n'y a pas de séquence peptidique clairement définie (Bond & Hanover, 2015). Cependant, il semblerait que les séquences peptidiques modifiées par la O-GlcNAcylation (de même que la phosphorylation) soient enrichies en acides aminés présentant des radicaux de petite taille, avec un résidu de proline à proximité, et que ces séquences aient des motifs structuraux secondaires de type boucle, ou des régions désordonnées, plutôt qu'une organisation en hélice α ou en feuillet β (Chen et al., 2006 ; Nishikawa et al., 2010 ; Xie et al., 2007a ; Xie et al., 2007b ; Yang et al., 2006b).

Tableau I : Points communs et différences entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation. (d'après Bond & Hanover, 2015).

	O-GlcNAcylation	Phosphorylation
		
Donneur	UDP-GlcNAc	ATP
Acides aminés accepteurs	Ser (R=H), Thr (R=CH ₃)	R=H, CH ₃ ou Tyr (non représentée)
Charge physiologique	non chargé	chargé négativement
Cycle addition/élimination	dynamique	dynamique
Enzyme(s) catalysant l'addition	OGT	multitude de kinases
Enzyme(s) catalysant son enlèvement	OGA	multitude de phosphatases

1.2. L'UDP-GlcNAc, donneur pour le résidu GlcNAc.

Pour catalyser l'addition du monosaccharide sur les protéines, l'OGT utilise l'UDP-GlcNAc, un nucléotide-sucré issu de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP, Hexosamine Biosynthesis Pathway, figure 17). Lorsque le glucose entre dans la cellule, il est immédiatement phosphorylé par l'hexokinase, et peut être dirigé vers les voies métaboliques de la synthèse de glycogène, vers la voie des pentoses phosphates, ou entrer dans le voie de la glycolyse après sa conversion en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase. Cependant, 2 à 5% du glucose entrant dans la cellule vont s'engager dans la voie de biosynthèse des hexosamines (figure 17) (Marshall et al., 1991). La glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) dirige le glucose vers cette voie en lui permettant l'entrée dans la voie des HBP. Cette enzyme relie le métabolisme glucidique avec le métabolisme protéique puisqu'elle nécessite la glutamine pour former la glucosamine-6-phosphate, qui sera acétylée par la glucosamine-6-phosphate acétyltransférase pour former la N-acétylglucosamine-6-phosphate (ce qui relie la voie des HBP avec le métabolisme lipidique pour la formation de l'acétylCoA). Celle-ci sera ensuite convertie en N-acétylglucosamine-1-phosphate par la N-acétylglucosamine phosphomutase. La voie des HBP s'achève par la formation de l'UDP-GlcNAc, substrat pour l'OGT, donneur pour la GlcNAc, grâce à l'action de l'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase ; outre la GlcNAc-1-phosphate, l'enzyme utilise également comme substrat l'uridine, issu du métabolisme nucléotidique.

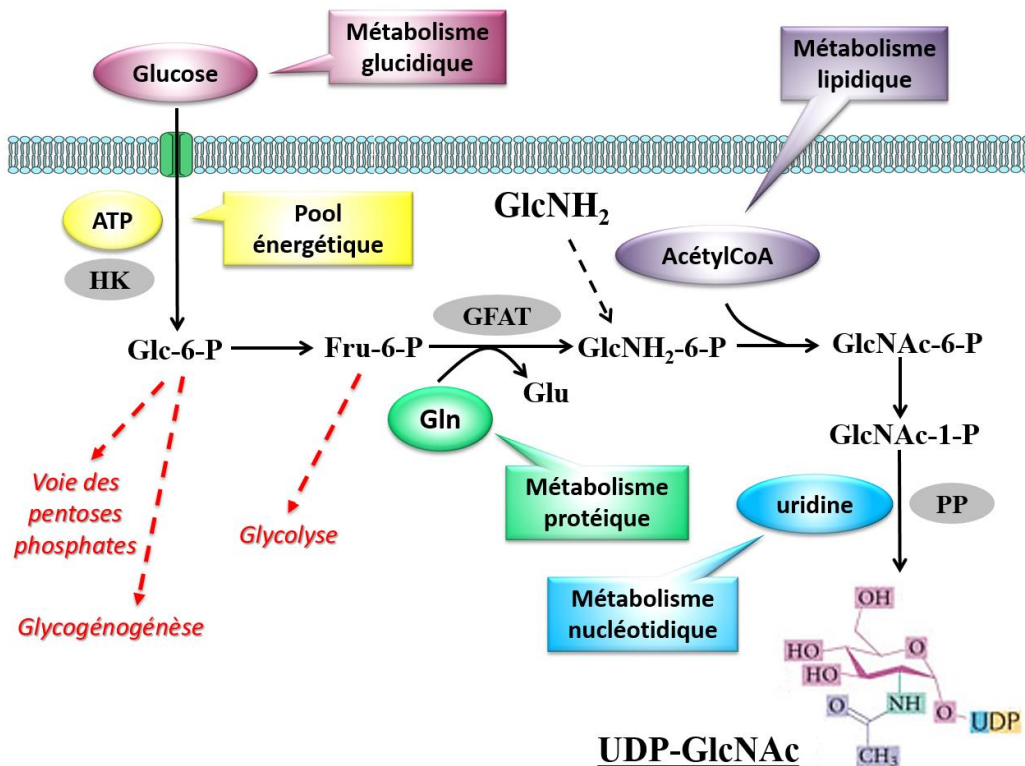


Figure 17 : Voie de biosynthèse des hexosamines, permettant la synthèse de l'UDP-GlcNAc à partir du glucose. Le glucose est métabolisé en intermédiaire de haute énergie, l'UDP-GlcNAc, servant de donneur de GlcNAc pour l'OGT dans le processus de O-GlcNAcylation. (HK : hexokinase ; GFAT : glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase ; PP : UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase).

L'enzyme limitante de cette voie métabolique est la GFAT, dans la mesure où il existe un rétro-contrôle négatif exercé par le produit final de la voie, *i.e.* l'UDP-GlcNAc, sur l'activité de la GFAT (Broschat et al., 2002 ; Marshall et al., 1991). Comme on peut le visualiser sur la figure 17, la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc peut être affectée par les différentes voies métaboliques de la cellule (métabolismes glucidique, protéique, lipidique, nucléotidique, énergétique).

1.3. Les enzymes du cycle O-GlcNAcylation/dé-O-GlcNAcylation.

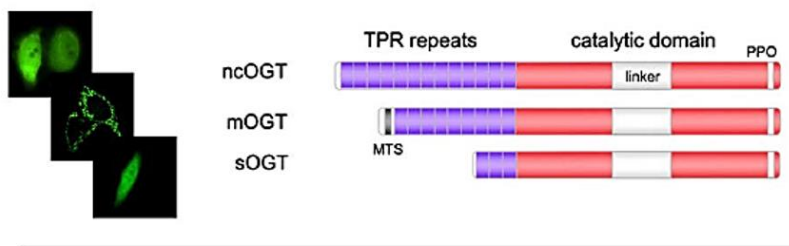
1.3.1. L'OGT, enzyme de la glycosylation.

L'enzyme responsable du transfert du résidu de GlcNAc sur les protéines est l'uridine diphospho-N-acétylglucosamine polypeptide β -N-acétylglucosaminyltransférase, ou OGT. Le gène codant pour l'OGT a été cloné de différents organismes, et est conservé au cours de l'évolution. Ainsi, le gène *OGT* présente 99% d'identité entre le rat et l'Homme, et 61% d'identité entre le rat et *Caenorhabditis elegans* (Haltiwanger et al., 1992 ; Kreppel et al., 1997 ; Lubas et al., 1997). Elle a également été caractérisée chez *Arabidopsis thaliana* (Jacobsen et al., 1996), ou encore chez certains protozoaires (Banerjee et al., 2009). Chez l'Homme, le gène codant pour l'OGT est localisé au niveau du chromosome X, plus spécifiquement dans la région Xq13.1, une région associée au développement de désordres neurologiques (Shafi et al., 2000). L'expression de l'OGT est comparable entre les différents tissus, avec un taux plus élevé dans le cerveau, le cœur, le pancréas, les muscles squelettiques (Lubas et al., 1997 ; Nolte & Muller, 2002), et est indispensable au développement puisque le knockout de l'OGT est létal dès le quatrième jour de développement d'embryons de souris (Shafi et al., 2000). Le gène *hOGT* code trois variants, résultant d'un épissage alternatif, pour lesquels la différence réside dans le nombre de motifs TPR (tetratricopeptide repeat) au niveau du domaine N-terminal, et dans la localisation cellulaire (Bond & Hanover, 2015). Le motif TPR est une répétition de 34 acides aminés, présentant une séquence consensus caractérisée par un pattern d'acides aminés hydrophobes ; il correspond à un module d'interactions protéine-protéine, et sert de médiateurs pour la formation de complexes multiprotéiques (Zeytuni & Zarivach, 2012).

La forme la plus longue de l'OGT (ncOGT, nucleocytoplasmic OGT) est localisée dans le noyau et le cytosol (Kreppel et al., 1997 ; Lubas et al., 1997). Les formes sOGT (short OGT) et mOGT (mitochondrial OGT) sont des formes un peu plus courtes, résultant d'un nombre de TPR moins important que la forme ncOGT (figure 18A) ; en effet, la sOGT et la mOGT possèdent 2.5 et 9 TPR, respectivement, tandis que la ncOGT possède 11.5 motifs TPR (Hanover et al., 2010). Ces motifs TPR permettant également la dimérisation de l'enzyme (figure 18B), nécessaire pour que l'enzyme soit active (Jinek et al., 2004). La mOGT possède de plus une séquence MTS (mitochondrial targeting sequence) localisée au niveau du domaine N-terminal. Toutes les formes d'OGT sont également caractérisées par la présence d'un domaine catalytique en C-terminal, ainsi qu'un domaine PPO (phosphoinositide binding domain) permettant à l'OGT de s'associer à la membrane (Yang et al., 2008).

L'OGT est une glycosyltransférase soluble, ne présentant que très peu d'homologie avec les glycosyltransférases membranaires du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi ; elle est très affine pour l'UDP-GlcNAc, avec un Km de l'ordre de 545 nM (Haltiwanger et al., 1992), ce qui lui confère un avantage vis-à-vis des transporteurs de nucléotide-sucres de la membrane du réticulum endoplasmique, puisque l'OGT et les transporteurs sont compétitifs pour l'UDP-GlcNAc cytoplasmique. L'activité de l'OGT et le taux global de O-GlcNAcylation sont directement influencés par le taux d'UDP-GlcNAc disponible dans la cellule (Kreppel & Hart, 1999) ou le compartiment cellulaire (Bond & Hanover, 2015 ; Shen et al., 2012). Outre son activité de glycosyltransférase, il a récemment été mis en évidence que l'OGT était impliquée dans la catalyse de la protéolyse du corégulateur transcriptionnel HCF-1 (Host cell factor-1), l'UDP-GlcNAc étant requis pour le clivage (Capotosti et al., 2011 ; Lazarus et al., 2013). Récemment, une O-GlcNAc transférase atypique, l'OGT extracellulaire (EOGT) a été caractérisée chez la souris et la drosophile, résidant dans la lumière du réticulum endoplasmique ; l'EOGT glycosyle des domaines « EGF-like » de protéines membranaires ou sécrétées, contribuant aux interactions cellule-matrice (Ogawa et al., 2014 ; Sakaidani et al., 2011 ; Sakaidani et al., 2012)

(A)



(B)

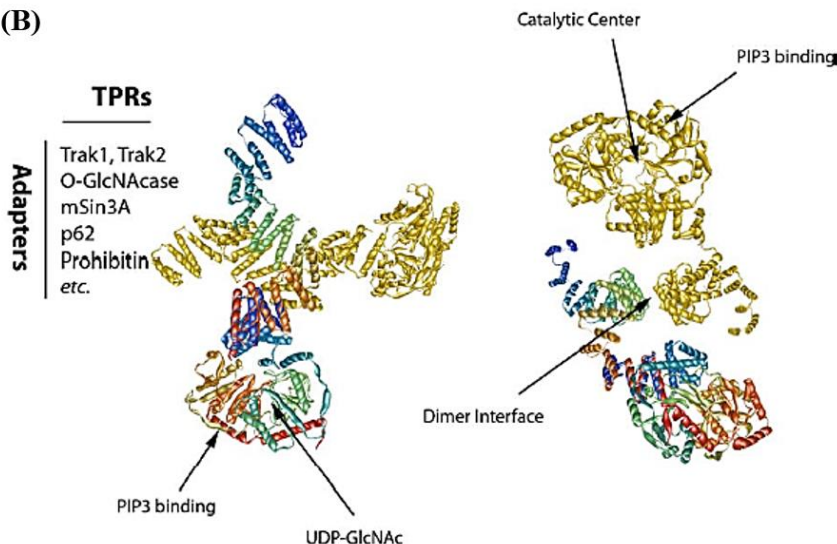


Figure 18 : Structure de l'OGT.

(A) Domaines structuraux de l'OGT, et les trois isoformes dérivées de l'épissage alternatif du gène de l'OGT : la ncOGT (nucleocytoplasmic OGT), la mOGT (mitochondrial OGT), et la sOGT (small OGT). (MTS : mitochondrial targeting sequence ; PPO : phosphoinositide binding domain). (B) Structure de l'OGT et indication de certains de ses partenaires protéiques. Notez la dimérisation de l'OGT. Sont également indiqués le domaine catalytique et le domaine de fixation au PIP3. (d'après Hanover et al., 2010).

Alors que l'on compte environ 600 kinases et phosphatases chez l'Homme, un seul gène est décrit pour l'OGT (et l'OGA, comme nous le verrons au paragraphe suivant). L'OGT est ainsi capable de transférer l'addition d'un résidu GlcNAc sur près de 4000 cibles protéiques (Ma & Hart, 2014). L'activité de l'OGT est donc régulée de différentes manières :

- l'épissage alternatif (Lazarus et al., 2006), permettant l'expression des trois variants ncOGT, mOGT et sOGT, comme nous l'avons vu ci-dessus ;
- une expression spécifique du tissu et de l'organelle ;
- une interaction avec ses substrats *via* les domaines TPR pour la reconnaissance de partenaires protéiques, certains étant indiqués sur la figure 18 (Lazarus et al., 2011) ;
- une interaction avec des protéines telles que MYPT1 par exemple, qui vont lui conférer sa spécificité vis-à-vis de certains substrats (Cheung et al., 2008)
- un changement de localisation de l'enzyme, par exemple son recrutement à la membrane par son domaine PPO (Whelan et al., 2008b ; Yang et al., 2008) ;
- des modifications post-traductionnelles de l'enzyme, notamment la phosphorylation au niveau de nombreux résidus de sérine et d'une thréonine dans le domaine N-terminal (Dephoure et al., 2008 ; Olsen et al., 2010) et d'un résidu de tyrosine dans le domaine C-terminal (Kreppel et al., 1997 ; Ryu & Do, 2011), la S-nitrosylation (Ryu & Do, 2011), ainsi que la O-GlcNAcylation au niveau des motifs TPR et du domaine catalytique (Tai et al., 2004) ;
- des modifications post-traductionnelles de ses substrats (Shen et al., 2012) ;
- le flux des nutriments (la voie des HBP utilisant des substrats issus des différentes voies métaboliques cellulaires) (Haltiwanger et al., 1992).

1.3.2. L'OGA, enzyme de la déglycosylation.

L'OGA, ou N-acétyl- β -D-glucosaminidase (ou O-GlcNAcase) est responsable de la réaction de déglycosylation des protéines O-GlcNAcylées ; elle était initialement identifiée comme l'hexosaminidase C, par analogie avec les β -hexosaminidases lysosomales. Cependant, contrairement à ces hexosaminidases acides, l'OGA a un pH optimum neutre, et est spécifique de l'hydrolyse du résidu GlcNAc et non GalNAc (Dong & Hart, 1994 ; Gao et al., 2001). L'OGA a été caractérisée chez l'Homme, le rat, la drosophile, ou encore *C.elegans* (Comtesse et al., 2001 ; Dong & Hart, 1994 ; Forsythe et al., 2006 ; Gao et al., 2001 ; Kelly & Hart, 1989). Comme le gène de l'OGT, le gène codant pour l'OGA est conservé au cours de l'évolution. L'OGA a été initialement identifiée comme la MGEA5 (meningioma-expressed antigen 5) ; le gène *MGEA5* localisé au niveau du chromosome 10, au locus 10q24.1, identifié comme un locus de susceptibilité au diabète de type II dans la population mexicano-américaine (Duggirala et al., 1999 ; Lehman et al., 2005).

L'hOGA existe sous forme de deux variants résultant d'un épissage alternatif : une isoforme longue (OGA-L, long OGA), et une isoforme courte (OGA-S, short OGA) (figure 19). Ces deux variants se distinguent par la présence du domaine histone-acétyltransférase (HAT) au niveau de l'extrémité C-terminale (Schultz & Pils, 2002 ; Toleman et al., 2004 ; Whisenhunt et al., 2006). Bien que des premières données *in vitro* aient suggéré une activité HAT (Toleman et al., 2004), d'autres travaux ne les ont en revanche pas confirmées (Butkinaree et al., 2008), mais ont plutôt suggéré d'après des données structurales que cette région correspond à un domaine pseudo-HAT, capable de fixer l'acétyl-CoA (He et al., 2014). L'OGA-L est localisée dans les compartiments cytosolique et nucléaire (Comtesse et al., 2001

; Gao et al., 2001 ; Wells et al., 2002a), tandis que l'isoforme courte est retrouvé au niveau des gouttelettes lipidiques (Keembiyehetty et al., 2011). Cette isoforme courte a une activité *in vitro* plus lente (Kim et al., 2006 ; Macauley & Vocadlo, 2009), suggérant que le domaine C-terminal pourrait intervenir pour l'activité et le recrutement de certains cofacteurs ou des protéines cibles. En revanche, les deux variants ont le même domaine de glycoside hydrolase (NAGidase, figure 19) au niveau du domaine N-terminal. Le domaine localisé entre les régions N- et C-terminales peut être clivé par la caspase 3, induite lors de l'apoptose (Butkinaree et al., 2008) ; lorsque l'OGA est clivée, il n'a pas été mesuré de différence de l'activité glycosidase, suggérant que les deux domaines N- et C-terminaux resteraient associés (Butkinaree et al., 2008 ; Wells et al., 2002a). Il est également important de noter qu'il existe un domaine de liaison à l'OGT (figure 19), mettant donc en évidence l'existence d'un complexe OGT-OGA, appelé O-GlcNAzyme (Whisenhunt et al., 2006). Enfin, comme l'OGT, l'OGA est phosphorylée sur de nombreux résidus de sérine et de thréonine (Khidekel et al., 2007 ; Olsen et al., 2010 ; Rigbolt et al., 2011 ; Trinidad et al., 2012), et est également O-GlcNAcylée (Khidekel et al., 2007 ; Rexach et al., 2010).

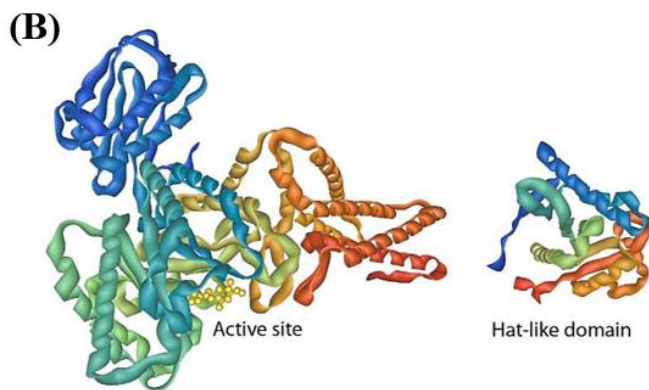
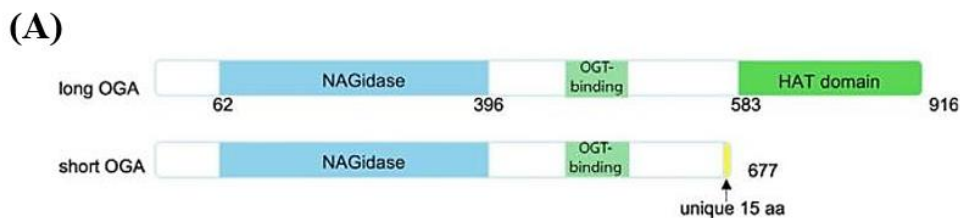


Figure 19 : Structure de l'OGA. (A) Domaines structuraux de l'OGA, et les deux isoformes dérivées de l'épissage alternatif du gène de l'OGA : la L-OGA (long OGA) et la S-OGT (short OGA). (NAGidase : N-terminal O-GlcNAcase domain ; HAT : histone acetyl-transferase domain). (B) Structure de l'OGA. (d'après Hanover et al., 2010).

1.4. Modulation du taux de O-GlcNAcylation.

Il existe de multiples inhibiteurs de l'OGA (figure 20, Gloster & Vocadlo, 2010). Initialement, les inhibiteurs utilisés pour inhiber l'OGA étaient la PUGNAc (Haltiwanger et al., 1998) ou la streptozotocine (Liu et al., 2000). Cependant, ces inhibiteurs avaient des effets délétères pour la cellule, en particulier la streptozotocine qui conduisait à la mort des cellules β pancréatiques (elle était d'ailleurs utilisée pour induire expérimentalement le diabète de type I) (O'Brien et al., 1996 ; Saini et al., 1996). Par ailleurs, la PUGNAc inhibe non seulement l'OGA, mais également des hexosaminidases lysosomales, conduisant à l'accumulation d'oligosaccharides libres (Mehdy et al., 2012) et à une résistance à l'insuline *in vivo* et *ex vivo* (Dehennaut & Lefebvre, 2013). Depuis, d'autres inhibiteurs ont été synthétisés, tels que les

GlcNAcstatines (Dorfmueller et al., 2006 ; Dorfmueller et al., 2009), ou des NAG-thiazolines telles que le NBUtGT (Macauley et al., 2005) ou le Thiamet G (Yuzwa et al., 2008).

Alors qu'il existe de nombreux inhibiteurs de l'OGA, il n'y a encore que peu d'inhibiteurs de l'OGT (Gloster & Vocadlo, 2010). Le premier inhibiteur utilisé pour bloquer l'OGT était un analogue de l'uracile, l'alloxane (Konrad et al., 2002 ; Liu et al., 2005 ; Liu et al., 2006a). D'autres générations d'inhibiteurs ont été depuis développés, tels que l'UDP-S-GlcNAc, qui n'a cependant qu'un effet inhibiteur *in vitro* (Dorfmueller et al., 2011), ou le 5-S-GlcNAc (figure 20), qui a démontré son efficacité *in cellulo* (Gloster et al., 2011).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité de l'OGT est dépendante et régulée par le taux d'UDP-GlcNAc. Ainsi, afin de moduler le taux global de O-GlcNAcylation, il est également possible d'augmenter ou de diminuer le flux à travers cette voie de biosynthèse des hexosamines. Ainsi, des inhibiteurs de la GFAT, tels que le DON (6-diazo-5-oxo-norleucine) (Kang et al., 2009) ou l'azasérine (Gao et al., 2003), vont conduire à la diminution du taux global de O-GlcNAcylation. En revanche, la glucosamine, qui va entrer dans la voie des HBP après la GFAT, va permettre l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation (Hinderlich et al., 2000).

Afin de limiter l'utilisation de molécules pharmacologiques pouvant induire des effets « off-target », une nouvelle approche méthodologique consiste en le blocage de l'expression des enzymes de la O-GlcNAcylation (OGT ou OGA). Ainsi, des travaux récents se sont reposés sur l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) (Dubois-Deruy et al., 2015 ; Fardini et al., 2013 ; Liu et al., 2015 ; Olivier-Van Stichelen S. et al., 2014 ; Zhang et al., 2015)

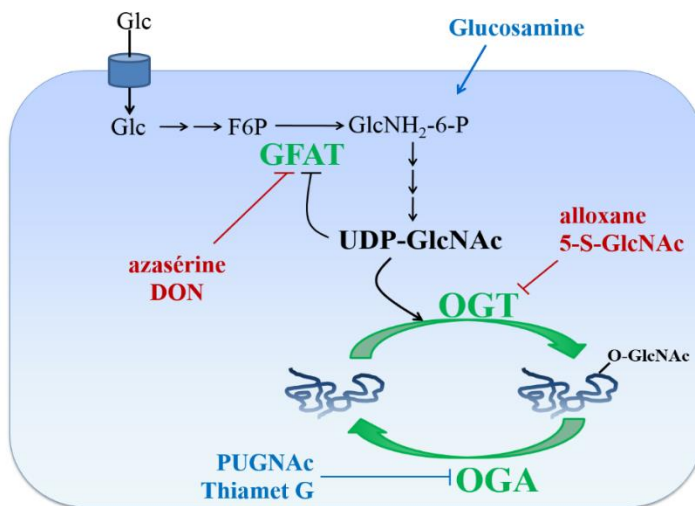


Figure 20 : Voie des HBP et processus de O-GlcNAcylation/ dé-O-GlcNAcylation. En vert sont indiquées les enzymes clés de ces voies : GFAT, OGT et OGA. En rouge sont indiqués quelques inhibiteurs de la GFAT ou de l'OGT, conduisant à une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation. En bleu, le composé saccharidique ou les molécules chimiques permettant une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation. Certains de ces inhibiteurs ont été utilisés dans le cadre de différents travaux présentés dans ce mémoire.

2. O-GlcNAcylation et phosphorylation : une interaction complexe entre ces deux modifications post-traductionnelles.

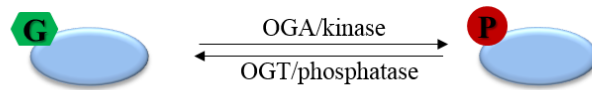
De l'ordre de 90-95% des protéines O-GlcNAcylées sont phosphorylées (Mishra et al., 2011). Il a été mis en évidence que la modulation du taux de phosphorylation pouvait influencer sur le taux de O-GlcNAcylation et réciproquement. Il a ainsi été démontré qu'interférer avec le cycle O-GlcNAcylation/dé-O-GlcNAcylation entraînait un changement du profil de

phosphorylation sur les résidus de sérine et de thréonine (Forsythe et al., 2006). De la même manière, l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation au niveau de cellules de mammifères conduit à un changement de la stœchiométrie des groupements phosphate au niveau de 70% des sites phosphorylés (Wang et al., 2008). A l'inverse, une hyperphosphorylation induite par l'acide okadaïque entraîne une diminution du taux global de O-GlcNAcylation (Lefebvre et al., 1999). De manière plus spécifique, l'inhibition d'une kinase particulière peut conduire à une augmentation de O-GlcNAcylation pour certaines protéines, et à une diminution de la glycosylation sur d'autres (Griffith & Schmitz, 1999 ; Wang et al., 2007).

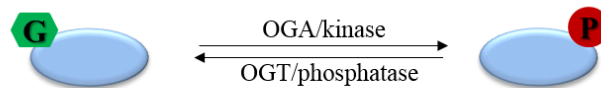
La réciprocity entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation au niveau d'un même site ou de site adjacents est aujourd'hui bien documentée (figure 21) (Zeidan & Hart, 2010). La compétition pour un site identique a été mise en évidence pour c-Myc (Chou et al., 1995), le récepteur β des œstrogènes (Cheng & Hart, 2001), le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Comer & Hart, 2001 ; Kelly et al., 1993), la chaîne régulatrice de la myosine cardiaque (Ramirez-Correa et al., 2008), ou encore eNOS (Du et al., 2001), tandis que la compétition impliquant des sites adjacents a été décrite pour p53 (Yang et al., 2006b), la calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase II (CamKII) (Dias et al., 2009), ou encore la vimentine (Slawson et al., 2008). Les deux modifications post-traductionnelles peuvent co-exister sur une même protéine, par exemple la protéine IRS (insulin receptor substrate) (Ball et al., 2006) ou la chaîne régulatrice de la myosine cardiaque (Ramirez-Correa et al., 2008).

Compétition

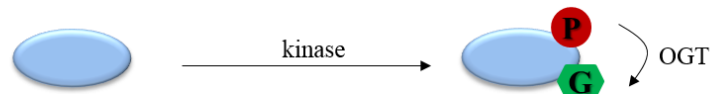
Mêmes sites ou sites voisins



Sites éloignés



Coopération



Indépendance

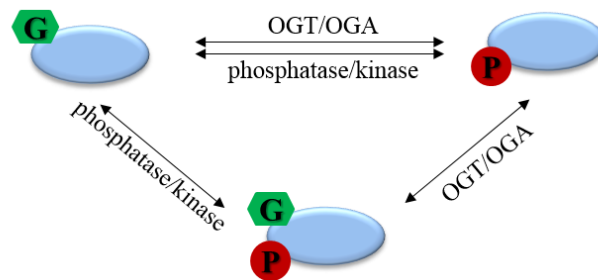


Figure 21 : Représentation schématique de la relation entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation pour une protéine donnée. (modifié d'après Hardiville & Hart, 2014).

Cette dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation peut également se produire sur des sites éloignés, comme cela a été décrit pour les cytokératines (Chou et al., 1992 ; Omary et al., 1998). Par ailleurs, la phosphorylation peut augmenter la O-GlcNAcylation d'une protéine donnée, telle que CREB (cAMP response element-binding protein) (Hardiville & Hart, 2014).

L'interaction entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation est en réalité beaucoup plus complexe que ce qui était initialement pressenti (Hardiville & Hart, 2014 ; Hart et al., 2011). En effet, certaines kinases ont leur activité modifiée par la O-GlcNAcylation. Par exemple, la CamKIV est glycosylée sur de multiples résidus au niveau ou à proximité de son site d'activation par phosphorylation, empêchant donc son activation puisque la CamKIV doit être déglycosylée pour pouvoir être activée par phosphorylation ; la mutation de ces sites de O-GlcNAcylation conduit à une activation constitutive de l'enzyme (Dias et al., 2009). Par ailleurs, la CamKIV peut également être O-GlcNAcylée au niveau du site de fixation de l'ATP, ce qui diminue l'affinité de la kinase pour l'ATP (Dias et al., 2009). La O-GlcNAcylation peut également moduler la stabilité, ainsi que la spécificité de substrat de certaines kinases telle que la caséine kinase 2, sans modifier son activité enzymatique (Tarrant et al., 2012)

Comme nous l'avons vu précédemment, l'OGT et l'OGA sont elles-mêmes phosphorylées. Le rôle de la phosphorylation sur l'OGA doit encore être élucidé, mais de nombreux travaux ont permis de caractériser le rôle de la phosphorylation de l'OGT. Ainsi, la phosphorylation de l'OGT par le récepteur à l'insuline, la CamKIV, ou la GSK3 β peut conduire à une augmentation de son activité ou moduler les interactions avec ses protéines partenaires et ses substrats (Bullen et al., 2014 ; Hart et al., 2011 ; Kaasik et al., 2013). Enfin, il a été démontré que le couple OGT/OGA peut interagir avec des couples kinases/phosphatases au sein de complexes multiprotéiques, permettant donc une dynamique élevée de phosphorylation et/ou O-GlcNAcylation au niveau de divers substrats (Slawson et al., 2008 ; Wells et al., 2004).

3. Fonctions biologiques exercées par la O-GlcNAcylation : quelques exemples.

La O-GlcNAcylation va ainsi participer à la modulation de multiples fonctions cellulaires (certaines étant représentées figure 22), telles que la transcription, la traduction, la sensibilité à l'insuline, la régulation de la signalisation intracellulaire, le trafic protéique, la dégradation protéique, (Banerjee et al., 2015 ; Hardiville & Hart, 2014 ; Hart et al., 2007 ; Hart et al., 2011 ; Hart, 2014 ; Harwood & Hanover, 2014).

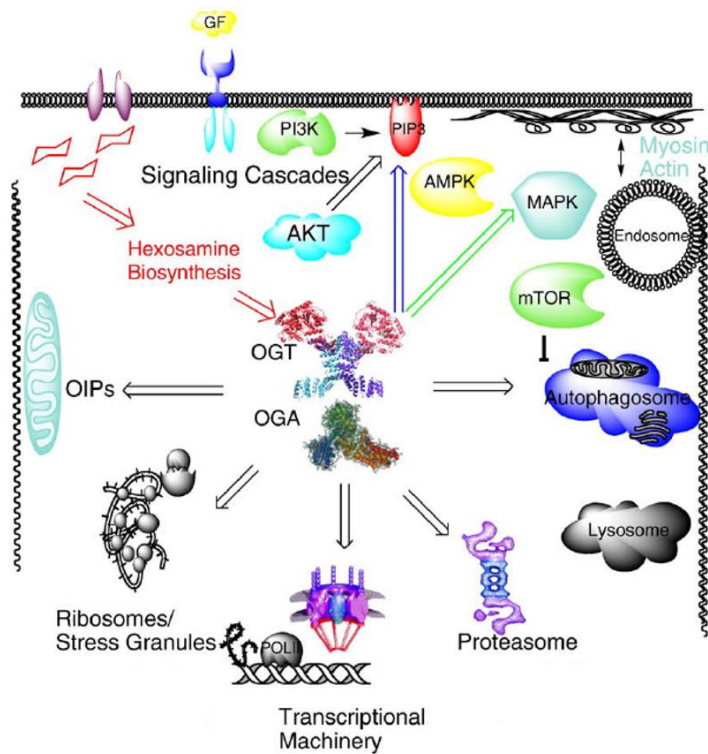


Figure 22 : Principales fonctions cellulaires régulées par la O-GlcNAcylation. (d'après Hanover et al., 2010).

3.1. Senseur nutritionnel.

L'activité de l'OGT est dépendante de la concentration en UDP-GlcNAc, mais sa spécificité dépend elle aussi de la concentration en nucléotide-sucre (Shen et al., 2012). Or, la concentration en UDP-GlcNAc varie entre différents types de tissus, mais aussi entre les différentes organelles (Bond & Hanover, 2013), et elle peut aussi varier lors de la différenciation, de l'inflammation, ou en réponse à différents stimuli. L'OGT peut alors être considérée comme un centre de contrôle, un « rhéostat », intégrant les signaux métaboliques, notamment *via* la voie de biosynthèse des hexosamines (figure 17), et contrôlant l'activité d'effecteurs *via* la O-GlcNAcylation (Hardiville & Hart, 2014 ; Hart et al., 2011 ; Hart, 2014 ; Harwood & Hanover, 2014). La O-GlcNAcylation étant sensible à l'insuline, aux nutriments, et au stress cellulaire, il a été proposé que la O-GlcNAcylation est un senseur nutritionnel, permettant de moduler la signalisation cellulaire et les voies de régulation de la transcription en réponse aux nutriments et au stress (Hart et al., 2011 ; Ngoh & Jones, 2008).

3.2. Réponse cellulaire au stress.

La O-GlcNAcylation exerce une fonction importante dans la réponse cellulaire au stress ; en effet, le taux de O-GlcNAcylation augmente après une exposition des cellules à différents stress (chaleur, sels, métaux lourds, UV, hypoxie...), ce qui contribue à l'augmentation d'expression de chaperons moléculaires, et à une diminution de leur turn-over (Zachara et al., 2004b ; Zachara & Hart, 2004). La O-GlcNAcylation pourrait aussi impliquer la stabilisation de la structure de la protéine, ou prévenir l'agrégation des protéines, potentiellement *via* l'interaction avec des protéines de choc thermique grâce à leur propriété lectinique (Guinez et al., 2004). Il semblerait donc que l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation, par exemple par l'inhibition de l'OGA, permette une meilleure résistance des cellules, tissus ou organes, à différentes formes de stress. Ainsi, il a été démontré un effet

protecteur de l'augmentation de la O-GlcNAcylation au niveau de certains tissus ou organes en cas de blessure ou d'hémorragie (Xing et al., 2008 ; Yang et al., 2006a), mais également au niveau du muscle cardiaque (Fulop et al., 2007a ; Fulop et al., 2007b ; Jones et al., 2008 ; Liu et al., 2006a).

3.3. Transcription et traduction.

Très rapidement après la découverte de la O-GlcNAcylation, il a mis en évidence que les protéines chromatiniennes étaient fortement O-GlcNAcylées (Kelly & Hart, 1989), et que la O-GlcNAcylation était corrélée avec les sites actifs de la transcription. La sous-unité catalytique de l'ARN polymérase II est fortement O-GlcNAcylée (Comer & Hart, 2001 ; Kelly et al., 1993), de même que de très nombreux facteurs de transcription (Jackson & Tjian, 1988 ; Jackson & Tjian, 1989). Il a d'abord été proposé que la formation du complexe d'initiation à un promoteur donné nécessitait la forme glycosylée de l'ARN polymérase, et que sa déglycosylation permettait sa phosphorylation et l'initiation du processus d'élongation (Comer & Hart, 1999). La O-GlcNAcylation modifie également de très nombreux facteurs de transcription ; selon le facteur de transcription, le monosaccharide peut moduler la fixation à l'ADN, l'activité transcriptionnelle, l'interaction protéine-protéine, la navette nucléocytoplasmique, ou encore la stabilité de la protéine (Ozcan et al., 2010). Par ailleurs, la O-GlcNAcylation joue un rôle prépondérant au niveau des histones, en modulant le « code des histones », permettant une régulation épigénétique de l'expression des gènes (Dehennaut et al., 2014 ; Hanover et al., 2012 ; Hardiville & Hart, 2014 ; Lewis & Hanover, 2014 ; Vaidyanathan et al., 2014).

Une vingtaine de protéines ribosomales sont modifiées par la O-GlcNAcylation (Zeidan et al., 2010). En particulier, la protéine ribosomale S6 présente une dynamique de O-GlcNAcylation différente de celle de la phosphorylation, et de manière intéressante, l'OGT et l'OGA sont associées avec les ribosomes. Il semblerait donc que la O-GlcNAcylation joue un rôle important dans la régulation de la traduction et la biogénèse des ribosomes (Zeidan et al., 2010).

3.4. Trafic des protéines et des organelles.

Il a été démontré que la O-GlcNAcylation pouvait moduler le trafic de certaines protéines à la membrane, comme pour la β -caténine, la E-cadhérine (Zhu et al., 2001) ou la synapsine (Cole & Hart, 1999). Elle peut aussi moduler au niveau subcellulaire de nombreuses protéines telles que c-Myc par exemple (Kamemura et al., 2002). La O-GlcNAcylation, par la modification des protéines des nucléoporines (Hanover et al., 1987 ; Holt et al., 1987 ; Starr & Hanover, 1990), modulerait la perméabilité des pores nucléaires, et donc les échanges nucléocytoplasmiques (Labokha et al., 2013).

Outre le rôle de la O-GlcNAcylation dans les processus de biogénèse, de fission, de fusion, de partition des mitochondries (Bond & Hanover, 2015), cette glycosylation intervient également dans le trafic des mitochondries *via* le recrutement de l'OGT au niveau du

complexe MIRO-Milton-TRAK pour moduler le mouvement de ces organelles le long des réseaux d'actine et des microtubules (Brickley et al., 2011 ; Pekkurnaz et al., 2014).

3.5. Turn-over protéique.

Plusieurs études ont montré que la O-GlcNAcylation pouvait ralentir la dégradation protéasomale de certaines protéines (Cheng et al., 2000 ; Chou et al., 1992 ; Chou et al., 1995 ; Han & Kudlow, 1997 ; Jiang & Hart, 1997 ; Srikanth et al., 2010 ; Yang et al., 2006b), en empêchant l'ubiquitination. La O-GlcNAcylation modifie des protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome, telles que l'enzyme E1 (E1-activating enzyme) (Guinez et al., 2008) et les sous-unités 19S (Zhang et al., 2003) et 20S (Overath et al., 2012). Elle diminue d'ailleurs l'activité du protéasome en inhibant l'activité ATPasique de la sous-unité 19S (Zhang et al., 2003). La O-GlcNAcylation est aussi liée à la régulation de l'autophagie, notamment le processus basal d'autophagie et la maturation de l'autophagosome (Guo et al., 2014 ; Kumar et al., 2014) ; de plus, certaines protéines clés de l'autophagie sont O-GlcNAcylées (Marsh et al., 2012)

3.6. Régulation de la signalisation intracellulaire.

De nombreuses protéines, notamment des kinases, impliquées dans les voies de signalisation régulant la croissance cellulaire, l'apoptose, l'activité de canaux ioniques, ou encore des protéines du cytosquelette, sont des cibles de la O-GlcNAcylation. Ainsi, la O-GlcNAcylation des isoformes de PKC induit une diminution de l'activité de la PKC- α (Robles-Flores et al., 2008) ; par ailleurs, il semblerait également que la O-GlcNAcylation puisse influencer sur l'association de certaines isoformes de PKC à la membrane, suggérant que la régulation de la PKC par la O-GlcNAcylation soit propre à chaque isoforme (Matthews et al., 2005). La p38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et ERK1/2 sont également modulées par la O-GlcNAcylation, ces dernières étant phosphorylées lorsque le taux de O-GlcNAcylation augmente (Laczy et al., 2009 ; Rexach et al., 2008), de même que la petite protéine G Rac (Li et al., 2007). La O-GlcNAcylation de protéines de la voie de signalisation à l'insuline est également bien documentée. De nombreuses protéines dépendantes de la signalisation à l'insuline sont O-GlcNAcylées (Whelan et al., 2010 ; Yang et al., 2008), et l'OGT, recrutée à la membrane par son domaine PPO, est essentielle pour assurer l'atténuation de la voie de signalisation dépendante de l'insuline (Ruan et al., 2013b ; Zeidan & Hart, 2010).

4. L'impact de la O-GlcNAcylation sur l'homéostasie et le développement de pathologies.

Etant donné le rôle de la O-GlcNAcylation en tant que senseur nutritionnel, et de par son interaction étroite avec les processus de phosphorylation, il n'est pas surprenant que la O-GlcNAcylation puisse jouer un rôle fondamental dans des pathologies chroniques, en

particulier le diabète, les maladies neurodégénératives, les pathologies cardiovasculaires, ou encore le cancer (figure 23).

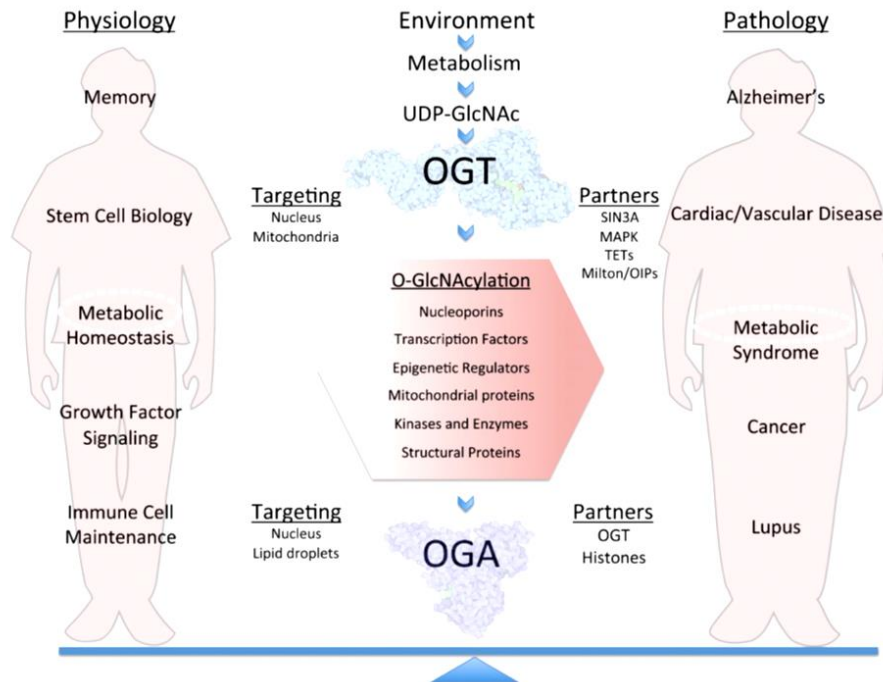


Figure 23 : La O-GlcNAcylation et son impact sur l'homéostasie physiologique et le développement de pathologies. La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle ubiquitaire, modulant l'activité cellulaire en réponse à des changements d'environnement, notamment de disponibilité en nutriments. La O-GlcNAcylation va influencer, via la modulation de diverses fonctions intracellulaires, sur de nombreux processus physiologiques, tels que l'immunité, le métabolisme ou la mémoire. Un dysfonctionnement du processus de O-GlcNAcylation est ainsi impliqué dans des maladies métaboliques, neurodégénératives, auto-immunes ou dans les processus de cancérisation. (modifié d'après Bond & Hanover, 2015).

4.1. Diabète de type II.

Le diabète de type II est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie et une résistance à l'insuline (Abdul-Ghani, 2013). La résistance à l'insuline est couplée à une toxicité au glucose, responsables de la plupart des complications associées à cette pathologie (Abdul-Ghani, 2013 ; Brownlee, 2001). La voie de biosynthèse des hexosamines a rapidement associée à l'étiologie du diabète et de la toxicité au glucose (McClain, 2002 ; McClain & Crook, 1996). Cependant, la raison pour laquelle l'hyperglycémie est tant délétère pour les cellules et les tissus est longtemps restée une énigme dans la mesure où le glucose n'est pas une molécule toxique pour la cellule. En réalité, les effets délétères de l'hyperglycémie sont liés à un déséquilibre de la dynamique phosphorylation/O-GlcNAcylation, notamment l'hyper-O-GlcNAcylation (Copeland et al., 2008), qui va altérer les voies de signalisation intracellulaires (Gandy et al., 2006 ; Park et al., 2005 ; Soesanto et al., 2008 ; Wang et al., 2012 ; Whelan et al., 2010), mais aussi l'activité ou le turn-over de facteurs de transcription causant ainsi une expression des gènes anormale (Andrali et al., 2007 ; Gao et al., 2003) dans différents tissus (Vaidyanathan & Wells, 2014).

4.2. Maladies neurodégénératives.

La O-GlcNAcylation est particulièrement abondante dans le cerveau. Un lien a été établi entre un défaut du métabolisme glucidique et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Dias & Hart, 2007). A ce titre, la maladie d'Alzheimer est également appelée diabète de type III (Kroner, 2009 ; Lefebvre et al., 2010 ; Pilcher, 2006). De nombreuses données supportent un rôle de la O-GlcNAcylation dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. En particulier, le métabolisme glucidique fait défaut, corrélé avec la diminution de la O-GlcNAcylation, et les protéines impliquées sont O-GlcNAcylées et phosphorylées, notamment la protéine Tau, fortement O-GlcNAcylée dans le cerveau sain, mais hyperphosphorylée au cours de la pathologie (Hart et al., 2011 ; Zhu et al., 2014). Alors que la O-GlcNAcylation semble avoir un rôle neuroprotecteur, des inhibiteurs de l'OGA pourrait donc être des outils thérapeutiques prometteurs pour le traitement de la maladie d'Alzheimer ou d'autres tauopathies (Vaidyanathan et al., 2014 ; Zhu et al., 2014).

4.3. Maladies cardiovasculaires.

De nombreuses données ont mis en évidence un effet cardioprotecteur de la O-GlcNAcylation, prévenant les dommages tissulaires lors de l'infarctus du myocarde, en particulier le stress oxydant, la surcharge de calcium, le stress du réticulum endoplasmique, ainsi que les lésions lors de l'ischémie/reperfusion (Chatham & Marchase, 2010 ; Fulop et al., 2007a ; Fulop et al., 2007b ; Jones, 2005 ; Marsh et al., 2014). Cependant, lorsque la O-GlcNAcylation est élevée de manière chronique, comme cela se produit dans le diabète, elle peut alors être impliquée dans la physiopathologie des cardiomyopathies (Clark et al., 2003 ; Hu et al., 2009 ; Ramirez-Correa et al., 2008), par différents mécanismes cellulaires tels que l'atténuation du flux autophagique, de la signalisation hypertrophique, de la fonction contractile et de la fonction mitochondriale (Marsh et al., 2014).

4.4. Cancer.

La cancérisation va être caractérisée par une reprogrammation métabolique, la glycolyse devenant la principale source énergétique. L'abondance du glucose dans le cytoplasme ne va pas uniquement contribuer à l'augmentation de la glycolyse, mais aussi le flux à travers la voie de biosynthèse des hexosamines (Ma & Vosseler 2014) ; en conséquence, le taux de O-GlcNAcylation sera augmenté. Or, de nombreux suppresseurs de tumeurs et oncogènes sont modifiés par la O-GlcNAcylation, parmi lesquels c-Myc (Chou et al., 1995), la protéine pRb (Wells et al., 2011), le suppresseur de tumeur HIC1 (Lefebvre et al., 2004b), la β -caténine (Sayat et al., 2008). L'augmentation de O-GlcNAcylation va donc conduire à des modifications des processus transcriptionnels, mais également des modifications des voies de signalisation, des processus métaboliques, ainsi que des changements dans le trafic des molécules d'adhésion. La O-GlcNAcylation va donc être impliquée dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, leur prolifération, leur survie, l'invasion, et le processus métastatique, ou encore l'angiogénèse, contribuant largement à la progression du processus de cancérisation (Ma & Vosseler, 2014).

Travaux personnels

Travaux personnels

J'ai choisi de présenter dans ce manuscrit certains des projets qui ont été ou sont actuellement développés dans notre équipe, qui sont à mon sens représentatifs de l'ensemble de mes travaux. Cette partie du mémoire est subdivisée en quatre chapitres, chacun d'entre eux étant introduit par un premier paragraphe correspondant à une revue de littérature sur le thème concerné :

- *Chapitre I : O-GlcNAcylation, protéomique & développement méthodologiques.* Je présenterai dans ce chapitre mes premiers travaux de protéomique qui sont, comme je l'ai précisé ci-dessus, initiateurs de nombreux projets de recherche. Je développerai également dans ce chapitre mes travaux de stage post-doctoral, ainsi que divers développements méthodologiques qui me serviront pour mes projets futurs ;
- *Chapitre II : O-GlcNAcylation, modulation de la contraction musculaire, & MLC2.* Les travaux présentés dans ce chapitre concernant plus spécifiquement la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation des propriétés d'activation calcique, avec un focus sur une protéine régulatrice de la contraction musculaire : la MLC2 ;
- *Chapitre III : O-GlcNAcylation & homéostasie protéique.* Dans ce chapitre seront abordés les travaux ayant permis de mettre en évidence l'implication de la O-GlcNAcylation dans le développement de l'atrophie fonctionnelle, mais également ceux concernant la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation dans l'homéostasie protéique, plus spécifiquement la néosynthèse protéique ;
- *Chapitre IV : O-GlcNAcylation & structuration sarcomérique.* Dans ce dernier chapitre, je mettrai l'accent sur des travaux permettant de faire le lien entre O-GlcNAcylation et la cytoarchitecture du sarcomère.

J'ai également fait le choix de présenter certains résultats clés issus de mes différents travaux, les publications étant quant à elles présentées dans le mémoire annexe.

CHAPITRE I

*O-GlcNAcylation,
protéomique & développements
méthodologiques*

CHAPITRE I

O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques

Comme je l'ai précisé ci-dessus, lorsque mes travaux de DEA puis de thèse ont débuté, il n'existait dans la bibliographie que très peu de données concernant le rôle de la O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique (six articles uniquement !). De plus, la plupart de ces études ne considéraient le muscle squelettique qu'en tant que modèle de tissu insulino-dépendant (Arias et al., 2004 ; McClain et al., 2002 ; Yki-Jarvinen et al., 1998). Nous avons alors envisagé d'identifier les protéines du muscle squelettique portant le motif O-N-acétyl-D-glucosamine, par une approche protéomique globale, dans le but de définir si la O-GlcNAcylation pouvait modifier des protéines au rôle fondamental dans le muscle squelettique. Nos travaux par la suite ont permis de démontrer que cette glycosylation était tout aussi essentielle à la physiologie musculaire que ne l'est la phosphorylation, fondamentale au bon fonctionnement du muscle squelettique.

La protéomique a toujours été associée de près ou de loin à mes activités de recherche, et certains projets de recherche qui seront développés dans les années à venir, et présentés dans ce mémoire, feront également appel à certaines stratégies de protéomique. C'est la raison pour laquelle il me semblait nécessaire de faire quelques rappels sur cette science des protéines qu'est la protéomique. Par la suite, je présenterai mes travaux liant O-GlcNAcylation, protéomique et muscle strié, notamment le muscle squelettique, certains de ces travaux correspondant à des développements méthodologiques nécessaires à des projets futurs.

1. Revue de littérature : la protéomique.

1.1. Quel est l'intérêt de l'analyse protéomique ?

Le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées à un moment donné dans une cellule, un tissu ou un organe (Wilkins, 1994). Le protéome est un système dynamique dans lequel les protéines présentent des propriétés interconnectées, qui ensemble, contribuent au phénotype d'une cellule (Larance & Lamond, 2015). Les protéines sont essentielles à la cellule ; effecteurs biologiques, ce sont elles qui assurent l'ensemble des fonctions indispensables à la vie cellulaire (Zhang et al., 2013). Les propriétés des protéines, incluant le niveau d'abondance, les interactions protéine-protéine, la localisation subcellulaire, les modifications post-traductionnelles, ainsi que les taux de synthèse et de dégradation, sont extrêmement dynamiques, et sont modifiés au cours de différents processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, ou encore la différenciation parmi d'autres (figure 24, d'après Larance & Lamond, 2015).

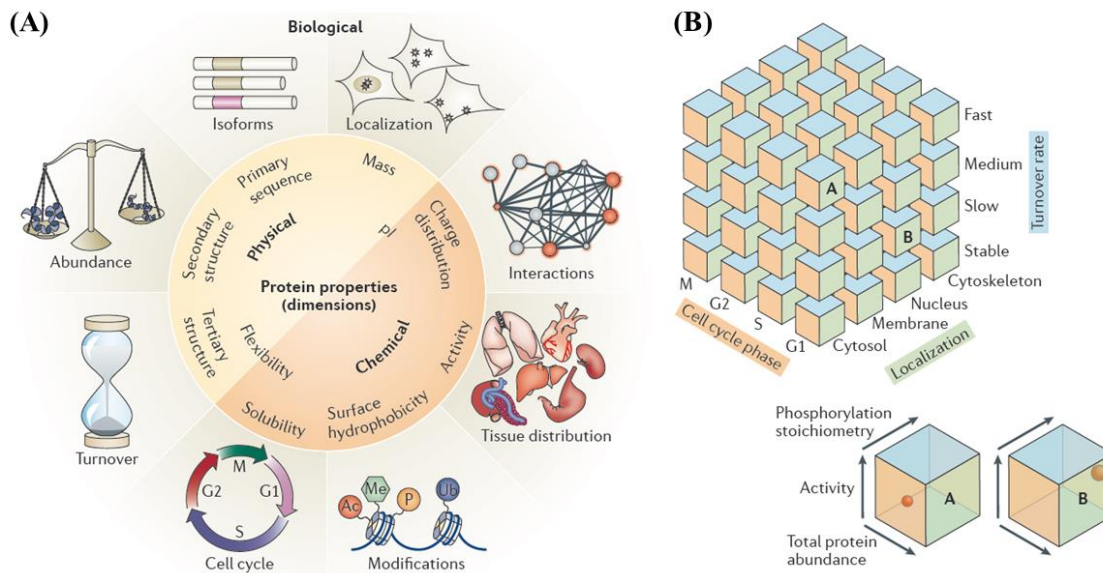


Figure 24 : De multiples propriétés (dimensions) des protéines, à l'origine de l'analyse protéomique multidimensionnelle. (A) Sont représentées des propriétés physiques (en jaune), chimiques (en orange), ou biologiques (en gris) des protéines (liste non exhaustive). Ainsi, comprendre la relation structure–fonction des protéines ne nécessite pas uniquement leur identification, mais également l'analyse détaillée de ces différentes propriétés. (B) Une série de cubes interconnectés est représentée, chacun d'entre eux contenant une fraction de données protéomiques pour une dimension (ici, par exemple, phase du cycle cellulaire, localisation, et turn-over protéique). (d'après Larance & Lamond, 2015).

La protéomique, science permettant l'étude des protéomes, constitue aujourd'hui un outil puissant permettant l'identification de marqueurs associés à une condition physiologique ou physiopathologique, car elle permet une description précise de la régulation de l'expression des gènes. C'est ce qui explique l'essor et le développement continu de nouvelles approches protéomiques, ainsi que l'augmentation du nombre de publications dédiées à la protéomique (Thelen & Miernyk, 2012). En effet, la protéomique s'attache à identifier les protéines extraites de cellules, d'un tissu ou d'un organe, ainsi que leurs modifications post-traductionnelles ou leur localisation subcellulaire. Elle peut également quantifier leur variation d'expression en fonction du temps, de l'environnement, de l'état physiologique ou pathologique, mais également des changements d'interactions entre une protéine et ses différents partenaires, qu'il s'agisse d'autres protéines ou d'acides nucléiques. Enfin, dans la mesure où le protéome va refléter tout changement infime dans l'environnement d'une cellule (signaux biologiques ou physico-chimiques, stades du cycle cellulaire, différenciation, pathogénèse...), la protéomique est une étude dynamique qui permet de visualiser tout changement traductionnel ou post-traductionnel de ces événements cellulaires.

1.2. Différentes stratégies pour l'analyse protéomique : « Bottom-up », « Top-down », ou « Middle-down » ?

L'approche protéomique est basée sur l'utilisation de techniques séparatives (permettant de séparer les protéines ou les peptides), de techniques analytiques, en particulier la spectrométrie de masse (permettant d'identifier ces protéines et de mettre en évidence leurs

modifications post-traductionnelles), et enfin de la bioinformatique (permettant une quantification du niveau d'expression d'une protéine, ainsi que la constitution de bases de données). Les récents progrès dans le domaine de la protéomique sont ainsi dus au développement et/ou à l'évolution de ces diverses technologies séparatives et analytiques, aussi bien pour l'acquisition des données que pour leur analyse (Zhang et al., 2013).

La première étape consiste généralement en l'extraction des protéines, qui peut éventuellement être suivie selon les protocoles expérimentaux d'un fractionnement du protéome, sur la base de leurs propriétés physico-chimiques, ou de la purification de classe particulière de protéines, par exemples les glycoprotéines ou les phosphoprotéines pour ne citer que ces catégories particulières de protéines qui nous intéresseront plus particulièrement dans ce mémoire. Cette première étape est fondamentale, car une mauvaise extraction peut générer une dégradation des protéines ou la perte de certaines de leurs modifications post-traductionnelles, générant une perte ou une déformation de l'information (Zhang et al., 2013). Les étapes suivantes vont dépendre de la stratégie d'analyse protéomique envisagée, à savoir la stratégie « Top-down », ou la stratégie « Bottom-up », les différences entre ces deux stratégies étant représentées schématiquement figure 25.

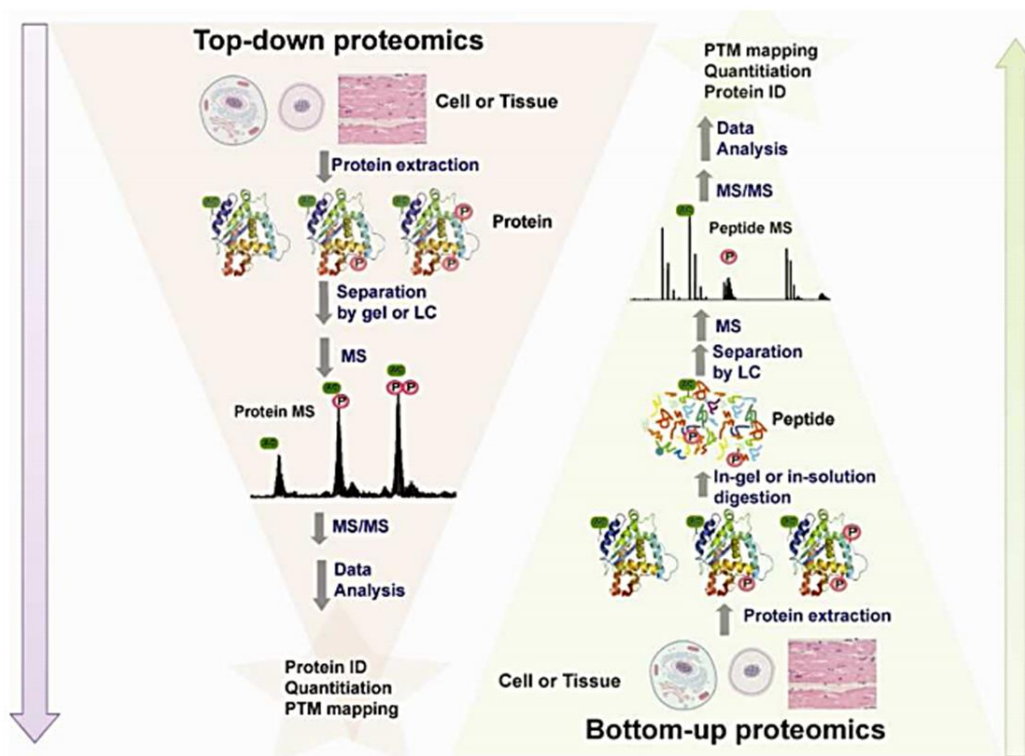


Figure 25 : Représentation schématique de la différence entre les stratégies protéomiques « Top-down » et « Bottom-up ». (d'après Gregorich et al., 2014).

L'analyse des protéines selon la stratégie « Bottom-up » se réfère à la caractérisation des protéines par l'analyse des peptides issus de la digestion protéolytique des protéines, la digestion par endoprotéases pouvant être effectuée soit sur des protéines préalablement séparées par SDS-PAGE, soit sur un mélange protéique en solution. Lorsque l'analyse « Bottom-up » est effectuée sur un mélange plus ou moins complexe de protéines, on parle de

protéomique « shotgun », terme proposé par Yates III (Yates, III, 1998). La protéomique « shotgun » permet une analyse indirecte des protéines par les peptides issus de la digestion protéolytique, ces peptides étant, dans les approches classiques, fractionnés par chromatographie liquide puis séquencés en spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Souvent la chromatographie liquide est dite multidimensionnelle, c'est-à-dire que les peptides sont séparés suivant deux phases, sur la base de leur propriétés physico-chimiques : c'est le MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology), qui combine une chromatographie liquide multidimensionnelle avec une ionisation par électrospray et la spectrométrie de masse en tandem (Wolters et al., 2001). La principale limitation de cette approche est que les différentes formes protéiques ne peuvent être différenciées sur la base d'un peptide (Larance & Lamond, 2015 ; Zhang et al., 2013). En effet, un même peptide peut être généré à partir de différentes isoformes protéiques et/ou de pools fonctionnels distincts d'une même protéine.

Dans le cas de l'analyse « Top-down », l'analyse est effectuée sur des protéines entières, intactes, qui ne seront pas soumises à une digestion protéolytique avant l'analyse en spectrométrie de masse. Les protéines seront séparées par chromatographie liquide, puis analysées directement par spectrométrie de masse haute résolution. Cette approche présente l'avantage de pouvoir mettre en évidence différentes formes d'une protéine suivant ses modifications post-traductionnelles, c'est-à-dire les protéoformes (Gregorich & Ge, 2014). Cette approche est plutôt réservée aux protéines de petites ou moyennes masses moléculaires, mais certaines protéines intactes de masse moléculaire supérieure à 200 kDa ont pu être identifiées (Han et al., 2006). Grâce à la séparation multidimensionnelle, une étude à grande échelle a récemment permis l'identification de plus de 1000 protéines (Tran et al., 2011). Cependant, l'approche « Top-down » présente des limitations non négligeables par rapport à l'approche « shotgun », inhérentes au fractionnement protéique, ainsi qu'à l'ionisation des protéines et à leur fragmentation (Zhang et al., 2013). Pour pallier à cet inconvénient majeur, une méthodologie « hybride » entre les approches « Top-down » et « Bottom-up » a émergé, en tant que protéomique « Middle-down ». Dans cette approche, une protéolyse limitée permet de générer de grands fragments peptidiques, de masse moléculaire beaucoup plus importante que dans le cas de l'approche « Bottom-up », ce qui permet de limiter la redondance peptidique entre les protéines, tout en favorisant l'ionisation des analytes par rapport à l'approche « Top-down ». En revanche, l'analyse de type « Middle-down » conserve l'avantage de l'approche « Top-down », notamment pour l'étude des modifications post-traductionnelles (Moradian et al., 2014 ; Switzar et al., 2013 ; Zhang et al., 2013).

1.3. Principales stratégies de protéomique quantitative.

Grâce aux progrès dans la préparation des échantillons, le fractionnement des peptides et des protéines, la sensibilité et la précision de la spectrométrie de masse, le protéome de certains organismes peut aujourd'hui être cartographié en routine grâce aux méthodes de « shotgun » (Zhang et al., 2013). Bien qu'initialement la protéomique était plutôt dédiée à l'identification des protéines d'un organisme, il est aujourd'hui devenu évident qu'une liste de protéines seule est insuffisante pour répondre aux diverses questions biologiques. En effet,

des changements d'expression des protéines peuvent refléter des modifications de certains processus biologiques, mais également des états pathologiques (ce qui peut conduire à l'identification de biomarqueurs ou de cibles thérapeutiques potentielles). Différentes stratégies dédiées à la protéomique quantitative (ou semi-quantitative) sont aujourd'hui disponibles (figure 26) ; ces stratégies sont basées sur des approches par gels bidimensionnels ou des approches par spectrométrie de masse. Dans ce cas, il est possible soit de marquer les protéines/peptides par des isotopes stables, en vue d'une quantification relative ou absolue, soit de quantifier l'expression des protéines sans marquage préalable (« Label-free »).

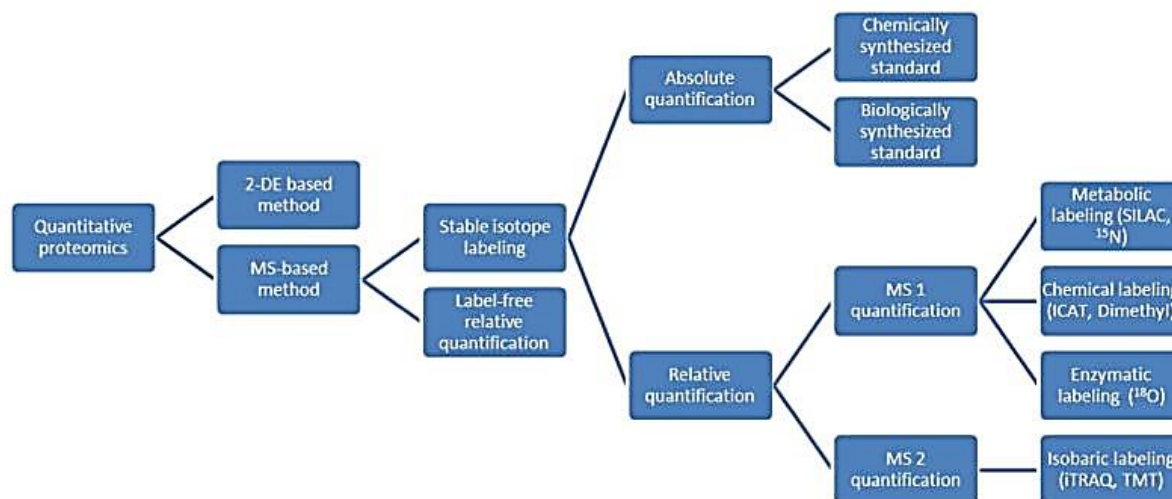


Figure 26 : Classification des différentes stratégies pour la protéomique quantitative. (Zhang et al., 2013).

1.3.1. Approche par 2-DE (two-Dimensional gel Electrophoresis)

Historiquement, l'électrophorèse bidimensionnelle, développée par O'Farrell (O'Farrell, 1975 ; O'Farrell, 2008) a joué un rôle fondamental dans le domaine de l'analyse protéomique puisqu'elle a permis son essor dans les années 2000s. Le principe général de cette méthodologie est représenté figure 27. Les protéines sont séparées selon deux dimensions : tout d'abord selon leur point isoélectrique (isoélectrofocalisation), puis en fonction de leur masse moléculaire (SDS-PAGE). Après la séparation électrophorétique, les protéines sont détectées ; cette détection des protéines repose sur l'utilisation de colorants organiques (bleu de Coomassie), de métaux (nitrate d'argent), ou encore l'utilisation de fluorophores (soit par marquage des protéines préalablement à l'électrophorèse, soit par l'utilisation de colorants fluorescents comme le ProQ Diamond ou le ProQ Emerald par exemple, pour la détection des phosphoprotéines ou des glycoprotéines respectivement). La gamme de détection varie d'un facteur d'environ 10000 selon la méthode de coloration utilisée, de l'ordre du microgramme pour le bleu de Coomassie, et de 0,1 ng pour la coloration au nitrate d'argent. Les colorants fluorescents classiques (« minimal dye »), bien que moins sensibles que le nitrate d'argent, présentent cependant une plus grande reproductibilité et gamme dynamique élevée.

Quelle que soit la méthode de détection utilisée, les gels sont analysés par un logiciel d'analyse d'images (SameSpots par exemple). Les protéines d'intérêt, visualisées sous forme de spots en 2D-PAGE, sont excisées du gel, puis soumises à une hydrolyse protéolytique, généralement par la trypsine. Dans cette stratégie « Bottom-up », les peptides générés par la protéolyse sont analysés par spectrométrie de masse. La masse moléculaire exacte des peptides ionisés est déterminée par spectrométrie de masse, souvent de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight, ionisation/désorption par tir laser assisté par matrice et mesure du temps de vol). Cette technique permet d'obtenir l'empreinte peptidique de la protéine (« peptide mass fingerprint »), c'est-à-dire un ensemble de masses moléculaires de peptides résultant de la digestion protéolytique, chaque protéine ayant une empreinte peptidique qui lui est propre. L'identification de la protéine est réalisée par comparaison de l'empreinte de masses peptidiques mesurées avec celle issue de peptides virtuels obtenus par la digestion théorique des protéines répertoriées dans les banques de données. Les informations de masse moléculaire et de point isoélectrique de la protéine sont également utilisées lors de l'interrogation des banques de données. Ces peptides (ions parents) peuvent également être fragmentés, ce qui permet de déterminer la séquence des peptides, obtenue par spectrométrie de masse en tandem dite MS/MS. Suit l'étape bioinformatique avec l'interrogation des banques de données : toutes les informations expérimentales obtenues (masse moléculaire apparente, point isoélectrique, empreinte peptidique, séquence peptidique) vont être comparées aux bases de données génomiques et protéomiques afin d'établir l'identité des protéines.

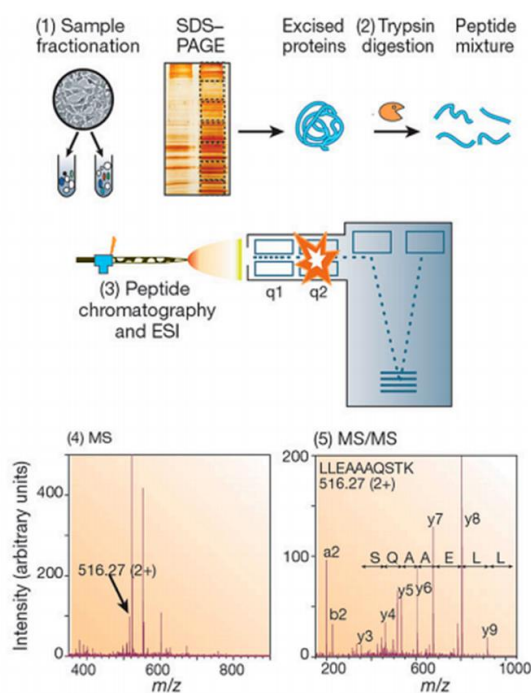


Figure 27 : « Workflow » classique pour l'analyse protéomique « in-gel ». L'extrait protéique peut être pré-fractionné, et les protéines séparées par électrophorèse en une ou deux dimensions. Les protéines d'intérêt découpées du gel sont soumises à une digestion trypsine, les peptides étant ensuite analysés en spectrométrie de masse. (d'après Feist & Hummon, 2015), modifié d'après Aebersold & Mann, 2003).

Cependant, il y a quelques années, l'utilisation de la technique de séparation des protéines sur gel 2-DE a été remise en question ; en effet, cette technique nécessite précision et dextérité manuelle pour être reproductible, et n'est pas compatible avec une approche de haut-débit. Pourtant, bien que souvent critiquée, la 2-DE reste encore très largement utilisée.

En effet, malgré ses limites, la 2-DE nous offre la possibilité de comparer des protéomes de cellules, de tissus ou d'organes, de visualiser l'activité cellulaire globale à un instant donné, dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques particulières (Fey & Larsen, 2001 ; Gorg et al., 2009 ; Rabilloud et al., 2010). De plus, grâce à la détection par fluorescence (2D-DIGE) ou autres approches multiplex, la reproductibilité, et avec elle, la puissance de l'outil, a fortement augmenté, rendant ainsi à la 2-DE ses lettres de noblesse (Oliveira et al., 2014 ; Rabilloud et al., 2010 ; Rabilloud, 2014).

1.3.2. Quantification par spectrométrie de masse.

Intrinsèquement, la spectrométrie de masse n'est pas à proprement parler quantitative. En effet, les peptides issus de la digestion protéolytique présentent des propriétés physico-chimiques extrêmement variées (taille, charge, hydrophobicité...), conduisant donc à des réponses très diverses en spectrométrie de masse, cette réponse étant propre à un peptide donné (Bantscheff et al., 2007). Pour une quantification précise, chaque peptide sera individuellement comparé entre les différentes conditions expérimentales. Ainsi, la spectrométrie de masse s'impose aujourd'hui comme un outil puissant pour la quantification de l'expression différentielle des protéines dans un échantillon biologique, aussi bien pour la quantification relative que pour la quantification absolue. Comme nous l'avons vu figure 26, la quantification par spectrométrie de masse peut être effectuée sans marquage (« label-free quantification ») ou après marquage des protéines (« label-based quantification »). Selon la stratégie choisie, la quantification peut nécessiter la fragmentation (MS2) ou non (MS1) du peptide (figures 26 ; tableau II).

1.3.2.1. Quantification relative.

Approche par marquage chimique. Initialement, la quantification par spectrométrie de masse reposait sur l'addition de réactifs isotopiques sur les groupements réactifs des chaînes latérales des acides aminés ou sur l'extrémité des peptides. La méthode ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) était basée sur le marquage des cystéines par un tag isotopique, composé de trois éléments : un groupement biotine, un groupe réactif spécifique des thiols, et un groupe de liaison contenant huit isotopes légers ou lourds (Gygi et al., 1999 ; Smolka et al., 2001). Les résidus de cystéine étaient donc dérivés par un réactif ICAT contenant huit atomes d'hydrogène ^1H ou huit atomes de deutérium ^2H (tableau II), et l'extrait protéique était ensuite purifié par chromatographie d'affinité sur avidine pour purifier les protéines marquées. Les protéines étaient ensuite digérées par la trypsine, et les peptides résultant analysés par LC-MS. Comme la cystéine n'est pas retrouvée systématiquement au niveau de tous les peptides, il y avait donc simplification de l'échantillon protéique. Cependant, le tag deutéré induisait un décalage du temps de rétention en chromatographie en phase inverse, ce qui rendait beaucoup plus complexe l'analyse des données (Regnier et al., 2002) ; une seconde génération de réactifs ICAT a donc été développée pour inclure un ^{13}C au lieu du ^2H (Yi et al., 2005). Une méthodologie similaire, l'ICPL (Isotope-Coded Protein Label), est basée sur des tags contenant six isotopes légers ^{12}C ou six isotopes lourds ^{13}C pour le marquage des fonctions

amines libres des protéines (Schmidt et al., 2005) (tableau II). Il est également possible de marquer chimiquement les protéines par l'intermédiaire du formaldéhyde afin d'introduire des groupes diméthyles en N-terminal ou au niveau des fonctions amines des résidus de lysine (Boersema et al., 2009 ; Hsu et al., 2003). Les avantages de ce marquage au diméthyle sont multiples ; notamment, le marquage est plus facile et efficace, et les réactifs moins onéreux. De plus, cette approche permet d'analyser trois échantillons biologiques par marquage des protéines avec le réactif « léger » (CH_3), « médium » (CHD_2) et « lourd » ($^{13}\text{CD}_3$).

Tableau II : Stratégies de quantification par spectrométrie de masse et par marquage isotopique. (d'après Zhang et al., 2013).

Méthode	Résidus marqués	Multiplexing	MS1/MS2	Shift de masse ou masse des ions « rapporteurs »
ICAT	Cys	2	MS1	+8 Da (lourd)
ICPL	Lys	2	MS1	+6 Da (lourd)
Diméthyle	N-term, Lys	3	MS1	+4 Da (medium) ; +8 Da (lourd)
^{18}O	C-term	2	MS1	+2, +4 Da (lourd)
SILAC	Lys, Arg	3	MS1	+4, +6, +8, +10 Da (lourd)
SILAM	Tout acide aminé	2	MS1	Typiquement > 10 Da (*)
iTRAQ	N-term, Lys	8	MS2	113-119, 121 Da (pour le 8-plex)
TMT	N-term, Lys	6	MS2	126-127 Da (pour le 2-plex) ; 126-131 Da (pour le 6-plex)

(*) le shift de masse est conditionné par le nombre d'atomes ^{15}N et/ou ^{13}C dans l'acide aminé et le peptide.

Approche par marquage « enzymatique » (marquage ^{18}O). L'isotope est ici introduit lors de la coupure enzymatique des protéines (Reynolds et al., 2002 ; Yao et al., 2001). Le groupe carboxyle C-terminal du peptide protéolytique est marqué par deux atomes d' ^{18}O par clivage de la liaison amide et échange d'atome d'oxygène en présence d'eau lourde. Les peptides non marqués et marqués pourront alors être distingués par un écart de masse de 4 Da (tableau II). Ce marquage isotopique par l'eau lourde est très facile à mettre en place, et ce à un coût réduit, mais l'inconvénient majeur reste un échange incomplet entre l' ^{16}O et l' ^{18}O , générant ainsi des peptides marqués avec un écart de masse de 2 ou de 4 Da par rapport au peptide non marqué (Julka & Regnier, 2004).

Approche par marquage métabolique. Un isotope stable (^{13}C ou ^{15}N) est incorporé dans les protéines lors de leur synthèse, et le marquage peut être effectué soit sur des cellules en culture (SILAC, Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell Culture) (Liao et al., 2008 ; Wu et al., 2004), soit au niveau de tissus (SILAM, Stable Isotope Labelling of Amino acids in Mammals) (Ong et al., 2002). L'isotope stable, porté par un ou plusieurs acide(s) aminé(s) (lysine et/ou arginine dans le cas du SILAC, tout acide aminé dans le cas du SILAM), est incorporé au niveau des protéines néosynthétisées pour générer un protéome « lourd » ; au contraire, le protéome dit « léger » correspondra à des protéines ayant incorporé le (ou les)

acide(s) aminé(s) naturel(s) (figure 28, tableau II). Les lysats « léger » et « lourd » (correspondant aux protéomes non marqué et marqué respectivement) sont mélangés ; ils sont distinguables en spectrométrie de masse, et la quantification (abondance relative des protéines) est réalisée à partir des spectres de masse en mesurant l'intensité des signaux obtenus pour les différents peptides (Beynon & Pratt, 2005 ; Ruse & Chen, 2015).

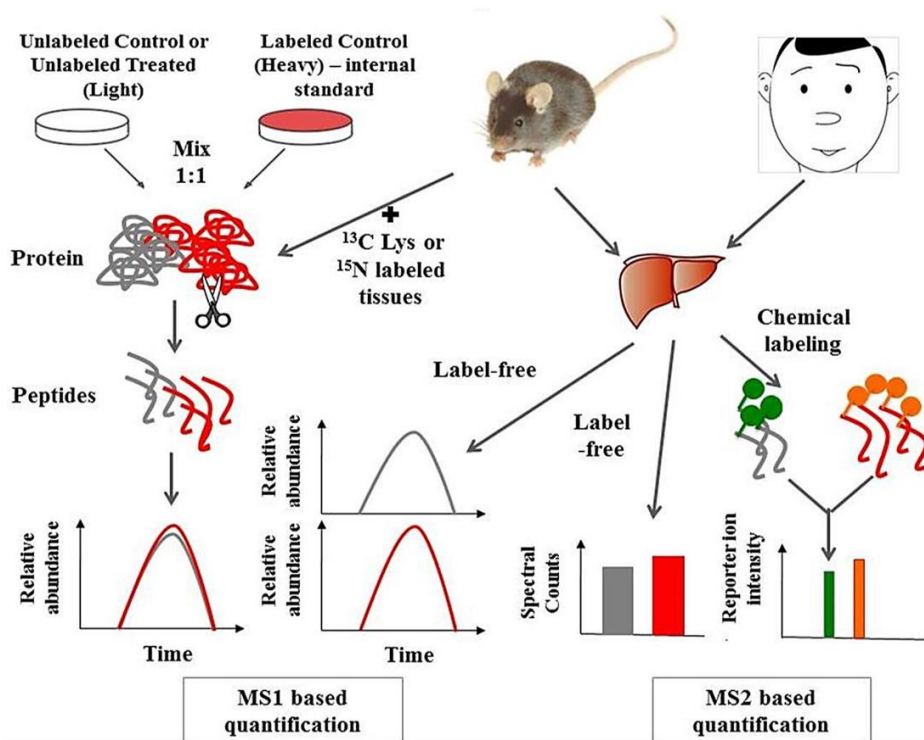


Figure 28 : Les différentes stratégies de protéomique quantitative par spectrométrie de masse. Les différentes approches méthodologiques peuvent nécessiter ou non un marquage préalable des protéines/peptides, et nécessiter ou non la fragmentation du (des) peptide(s) pour la quantification. (d'après Ruse & Chen, 2015).

La quantification par SILAC est relativement simple à mettre en œuvre, et permet d'obtenir des données de quantification avec beaucoup de précision. Elle ne nécessite pas de condition particulière d'acquisition. Cependant, pour que la quantification soit fiable, le marquage doit être complet ; or, en raison de composants naturels résiduels dans les sources nutritionnelles, et en raison du recyclage des acides aminés, le marquage n'est pas complet, et les peptides peuvent être présents sous forme non marquée et sous forme marquée. Ce phénomène est beaucoup plus marqué pour l'approche par SILAM (Zhang et al., 2013). Afin d'avoir un marquage complet, il peut être envisagé de débiter le marquage *in utero* (Liao et al., 2008).

Approche par marquage isotopique et quantification MS2. Les réactifs iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) (Ross et al., 2004) et TMT (Tandem Mass Tags) (Thompson et al., 2003) sont constitués de plusieurs groupements fonctionnels : un groupe « rapporteur » (dont la masse moléculaire est variable lors d'une stratégie multiplex), un lien clivable servant de « contreponds », et un groupement amine réactif (figure 29). Tous ces tags multiplex ont la même masse moléculaire en MS1 ; ainsi, lorsque les peptides issus

de protéome différentiels sont marqués avec ces tags multiplex *via* le groupement réactif, ils vont co-élués en chromatographie liquide, et donc être co-isolés pour la fragmentation lors de la MS/MS. La molécule de liaison sera alors fragmentée, relâchant le « rapporteur », dont l'intensité représente l'abondance relative du peptide originel (Zhang et al., 2013).

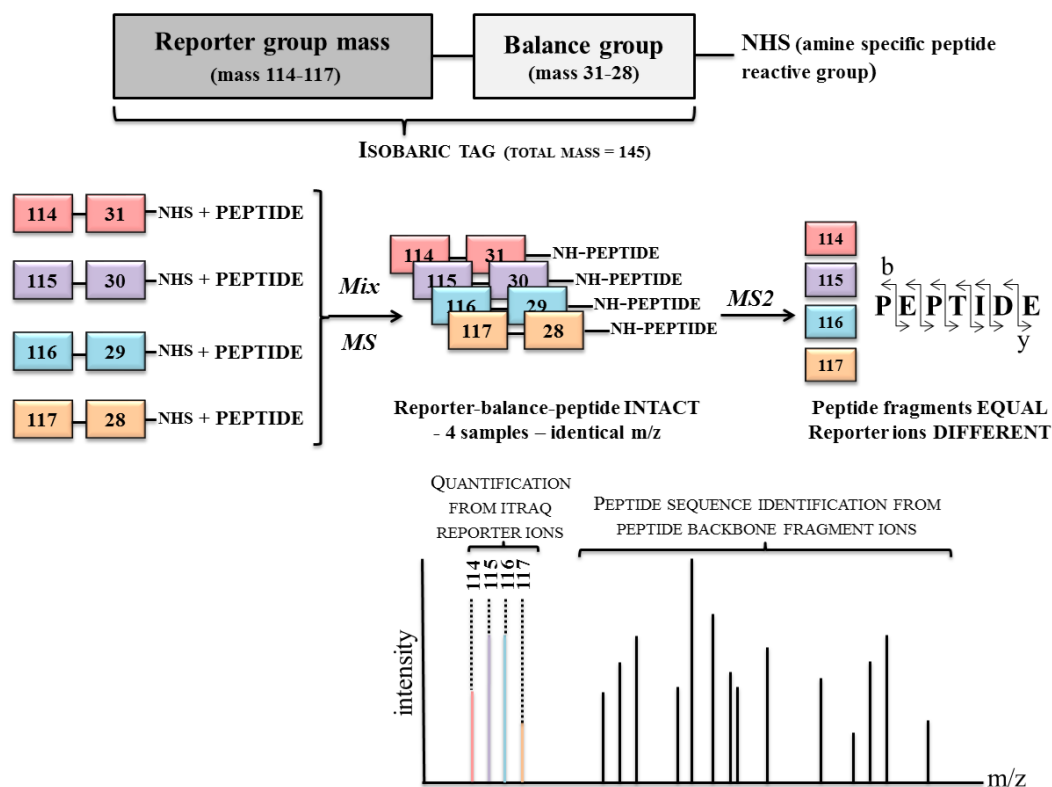


Figure 29 : Représentation schématique des différents composants pour le marquage isobarique multiplex et la quantification par spectrométrie de masse. Quatre échantillons biologiques peuvent ici être marqués par différents tags, caractérisés par un rapporteur de masse différentes (114, 115, 116 ou 117 Da), et être simultanément analysés par spectrométrie de masse en vue d'une analyse quantitative : c'est un 4-plex. (modifié d'après Ross et al., 2004).

Cette stratégie de marquage isobarique permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons biologiques, jusqu'à six échantillons (6-plex) (Dayon et al., 2008) pour la TMT et 8 échantillons (8-plex) pour l'iTRAQ (Ow et al., 2008) (tableau II), ce qui permet de réduire significativement le temps d'analyse, comparativement aux autres approches de marquage isotopiques qui ne permettent la comparaison qu'entre deux ou trois isotopes (Zhang et al., 2013). De plus, l'iTRAQ n'augmente pas la complexité du scan en MS1 par rapport à d'autres approches quantitatives puisque tous les tags conduisent à la même augmentation de masse pour les peptides marqués. Cependant, les réactifs isobariques sont indétectables lors de la fragmentation conventionnelle par CID (Collision Induced Dissociation) et nécessitent une dissociation par collision de haute énergie (HCD, Higher-energy Collisional Dissociation) (Kocher et al., 2009 ; Pichler et al., 2011). Les spectres MS2 résultants sont de meilleure qualité puisque la précision des mesures de masses est plus élevée, mais le temps d'analyse est augmenté, et une plus grande quantité d'ions est nécessaire pour cette analyse.

Approche sans marquage : approche « label-free ». Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la quantification par spectrométrie de masse est généralement effectuée après un marquage isotopique des peptides, le marquage pouvant être effectué par voie chimique, enzymatique ou métabolique. Cependant, la quantification après marquage isotopique souffre d'un certain nombre de limitations, notamment les différentes étapes de préparation, de manipulation des échantillons, le coût parfois prohibitif des réactifs de marquage (notamment pour le SILAM), le marquage incomplet, des difficultés d'analyse des peptides peu abondants, la limitation du nombre d'échantillons analysés... (Zhang et al., 2010 ; Zhang et al., 2013). Ainsi, la méthode de quantification « label-free » est souvent utilisée lorsque le marquage par isotope stable n'est pas envisageable. La quantification de l'expression des protéines peut être effectuée de deux manières : (i) le comptage de spectres (« spectral counting ») est basée sur la fréquence d'identification d'un peptide appartenant à une protéine donnée, fonction de l'abondance relative de cette protéine, et (ii) l'intensité de l'ion (« peptide-ion intensity »), basée sur l'intensité du signal chromatographique d'un pic correspondant à un peptide appartenant à une protéine donnée (figure 30).

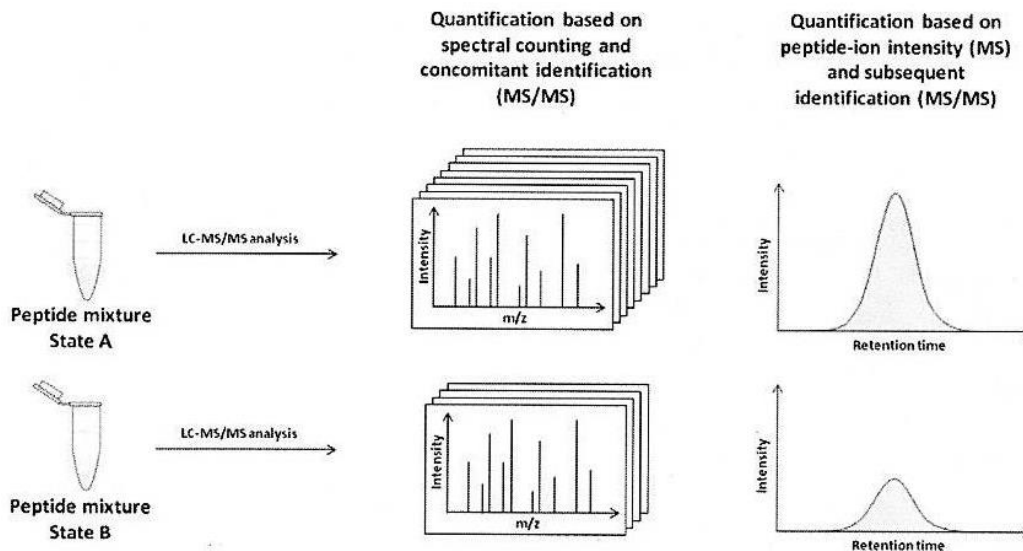


Figure 30 : Représentation schématique des deux approches de quantification par spectrométrie de masse sans marquage des protéines/peptides (« label-free »). Dans l'approche par « spectral counting », l'abondance d'un peptide (et par extension de la protéine) est estimée d'après le nombre de spectres MS2 acquis pour un peptide donné. Dans l'approche par « peptide-ion intensity », le changement d'abondance d'un peptide est déterminé par mesure de la surface du pic chromatographique du peptide correspondant. Les deux approches indiquent que l'abondance du peptide est supérieure dans la condition expérimentale A. (modifié d'après Megger et al., 2013).

Approche « label-based » vs approche « label-free ». L'introduction d'isotopes lourds, stables (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O), dans les protéines d'un échantillon biologique permet de « produire » un échantillon marqué, qui sera comparé à un échantillon non marqué, contenant les isotopes naturels. Ce marquage permet une quantification relative à grande échelle des protéines constitutives du protéome d'intérêt et de déterminer la variation entre deux (voire plus) conditions expérimentales (Aggarwal et al., 2006 ; Filiou et al., 2012 ; Ong et al., 2003). L'introduction des marqueurs différentiels de masse lors des approches *in vitro* se déroule lors de la préparation des échantillons, et est dépendante de l'échantillon et de l'organisme. Afin

de limiter ces biais expérimentaux, l'introduction de ces isotopes doit avoir lieu aux stades initiaux de l'expérience de quantification relative, et en ce sens, le marquage métabolique *in vivo* permet de limiter la variabilité entre les échantillons inhérente au marquage des échantillons (Bantscheff et al., 2007). Ces marquages métaboliques sont effectués en culture cellulaire ou chez l'animal, et aujourd'hui, le SILAM a été appliqué avec succès dans différentes espèces animales (Filiou et al., 2012 ; Gouw et al., 2010). Cependant, il a été décrit dans la littérature une altération du phénotype chez la souris (Frank et al., 2009), et ce marquage métabolique est incompatible avec l'analyse d'échantillons humains. Pour un marquage métabolique *in vivo*, il faut également souligner le coût très important des réactifs de marquage, mais aussi la nécessité d'un marquage pendant plusieurs semaines voire sur une seconde génération (Filiou et al., 2012).

L'analyse protéomique quantitative « label-free » est quant à elle basée sur la quantification relative de peptides en MS1 ou en MS2 (Lundgren et al., 2010 ; Neilson et al., 2011). Puisqu'elle ne nécessite aucun marquage préalable, cette méthode est extrêmement simple à mettre en œuvre, et à un coût très faible puisqu'aucun réactif isotopique n'est nécessaire. Cependant, l'inconvénient majeur de cette approche méthodologique est la reproductibilité des résultats puisque la comparaison des spectres de masse repose sur la constance des analyses de chromatographies ou de spectrométrie de masse. Or, les temps de rétention ou les intensités de pics peuvent varier au cours du temps sur un instrument donné ou entre différentes expériences (Schulze & Usadel, 2010). Pour pallier à ce problème de reproductibilité, les échantillons sont analysés en plusieurs réplicats, augmentant considérablement le temps d'analyse.

La comparaison entre les différentes approches est présentée tableau III.

Tableau III : Comparaison des différentes méthodes de quantification (relative) par spectrométrie de masse. (modifié d'après Ruse & Chen, 2015).

Label-based or label-free approaches	Method of quantification	Multiplexing capability	Accuracy	Precision	Linear dynamic range	Cost of implementation	Easiness of implementation
Metabolic labeling	¹³ C, ¹⁵ N labeled amino acids, in vivo and in vitro labeling MS1-based quantification	Medium	+++	++	2 logs	Medium to high	++
Chemical labeling	Isobaric mass tags MS2-based quantification	High	++	+++	2 logs	High	+**
Label free	MS1- based quantification (peptide ion intensity) MS2-based quantification (spectral counting)	No	++*	++	2-3 logs	Low	+++

(*) more susceptible to instrumentation variability

(**) require special data acquisition strategy

1.3.2.2. Quantification absolue.

La quantification relative, telle que nous l'avons décrite précédemment, fait aujourd'hui partie des méthodes standard pour obtenir diverses informations quant à l'altération de l'expression des protéines. A côté de la quantification relative, la quantification absolue permet quant à elle d'accéder à des informations beaucoup plus précises concernant les protéines et leurs modifications post-traductionnelles, telles que la quantité de protéines, leur dynamique, ou encore leur stœchiométrie au sein de complexes multiprotéiques, parmi d'autres phénomènes biologiques.

Le principe général de la quantification absolue est l'introduction de standards marqués par un isotope stable dont l'abondance aura été préalablement définie. Cette méthode est équivalente à l'analyse par dilution isotopique, initialement utilisée pour la détermination de la quantité de petites molécules (Bowers et al., 1993). Contrairement aux stratégies de marquage que nous avons précédemment détaillées pour la quantification relative, l'utilisation de standards marqués par un isotope stable est également une méthode utilisée pour la quantification absolue des protéines : il s'agit de la méthode AQUA (Absolute QUAntification of proteins) (Gerber et al., 2003). Dans le cas le plus simple, la quantification absolue est réalisée par addition dans l'échantillon biologique d'une quantité connue d'un peptide standard synthétique (ou d'un nombre limité de peptides), suivie de la comparaison avec les signaux massiques obtenus pour le peptide endogène (figure 31). Ainsi, contrairement aux stratégies de marquage pour la quantification relative, qui s'adressent à un très grand nombre de protéines au sein de l'échantillon biologique, cette stratégie AQUA se focalise sur la détermination de la quantité d'une ou de quelques protéines d'intérêt (Bantscheff et al., 2007). Cette approche est donc particulièrement attractive pour la quantification de biomarqueurs dans des échantillons biologiques provenant d'une cohorte de patients, mais aussi pour la mesure de modifications particulières de protéines, par exemple pour certaines modifications post-traductionnelles (Bantscheff et al., 2007).

Cette méthode a évolué vers l'expression de standards peptidiques concaténés (QconCAT, figure 31) qui, après digestion trypsique, vont conduire à différents peptides d'une protéine d'intérêt, ou d'un groupe de protéines d'intérêt (Beynon et al., 2005). Outre la présence de plusieurs peptides standards, permettant d'améliorer la précision de mesure, ces protéines synthétiques sont ajoutés plus tôt dans le processus de préparation des échantillons, ce qui permet de limiter d'éventuels biais expérimentaux liés à la manipulation des échantillons (Bantscheff et al., 2007). Cette stratégie QconCAT peut aujourd'hui inclure une cinquantaine de peptides standards, correspondant à 20-30 protéines (Brownridge et al., 2011). Il est important de souligner que la QconCAT, tout comme l'AQUA, n'est pas compatible avec un fractionnement protéique préalable (Zhang et al., 2013). Pour pallier à cela, la méthode PSAQ (Protein Standard for Absolute Quantification ou Absolute SILAC) correspond à l'introduction d'une protéine standard intacte au lieu d'un peptide standard (Brun et al., 2007). La PSAQ permet de générer plusieurs peptides qui, issus d'une seule protéine, permettront la quantification de cette unique protéine ; cette protéine standard, ajoutée à l'échantillon biologique dès le début de l'analyse, est compatible avec un fractionnement protéique.

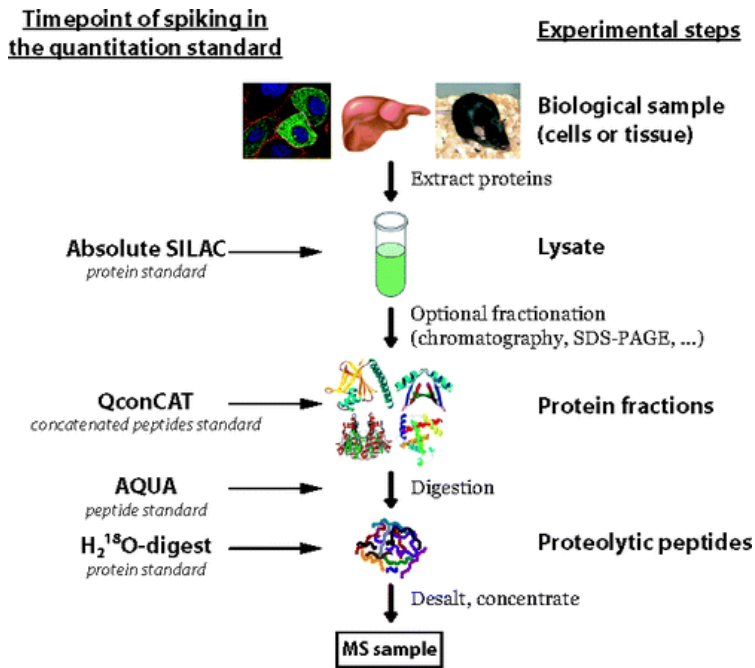


Figure 31 : Quantification absolue par spectrométrie de masse. Le standard marqué par un isotope stable peut être introduit à différents moments du processus d'analyse protéomique. (d'après Hanke et al., 2008).

Aujourd'hui, la protéomique quantitative a tenu toutes ses promesses pour une approche ciblée, limitée à un nombre (très) restreint de peptides/protéines, en lien avec la nécessité de synthétiser des standards marqués. En plus de cette limitation inhérente à l'approche méthodologique, le degré de précision entre la quantité mesurée et la quantité réelle au sein de l'échantillon biologique reste discutable. En effet, la durée de préparation des échantillons, ainsi que les traitements chimiques ou physiques des échantillons peuvent amener un biais expérimental, par exemple la dégradation de la (ou les) protéine(s) d'intérêt, si bien que la quantification expérimentale de la protéine peut être différente de sa quantité effective dans l'échantillon biologique (Zhang et al., 2013).

1.3.3. Autres approches d'analyse protéomique.

1.3.3.1. SELDI-TOF MS.

Le SELDI-TOF MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry) est une approche d'analyse protéomique qui a émergé il y a une vingtaine d'années, suite aux travaux de Hutchens et Yip (Hutchens & Yip, 1993). Contrairement à l'analyse par LC-MS, basée sur l'élution des peptides/protéines, le SELDI-TOF MS combine rétention et spectrométrie de masse. Les protéines sont capturées par adsorption, partition, interaction électrostatique ou par affinité sur différents types de puces à protéines (figure 32A). Le SELDI-TOF peut être considéré comme une extension de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF ; en effet, dans les deux méthodes, les protéines sont co-cristallisées avec une matrice, puis vaporisées sous un laser pulsé (Issaq et al., 2002 ; Vorderwülbecke et al., 2005). Les protéines ionisées sont ensuite accélérées dans un champ électrique, et les ratios masse/charge des différentes espèces ioniques sont déduits de leur vitesse et de leur « temps de vol » (figure 32B). La différence majeure entre SELDI-TOF et MALDI-TOF correspond à la surface de la cible ; en particulier, les surfaces chromatographiques dans le cas de l'analyse par SELDI-TOF permettent de retenir spécifiquement des protéines à partir

d'un échantillon protéique complexe suivant leurs propriétés physico-chimiques (Issaq et al., 2003 ; Vorderwülbecke et al., 2005).

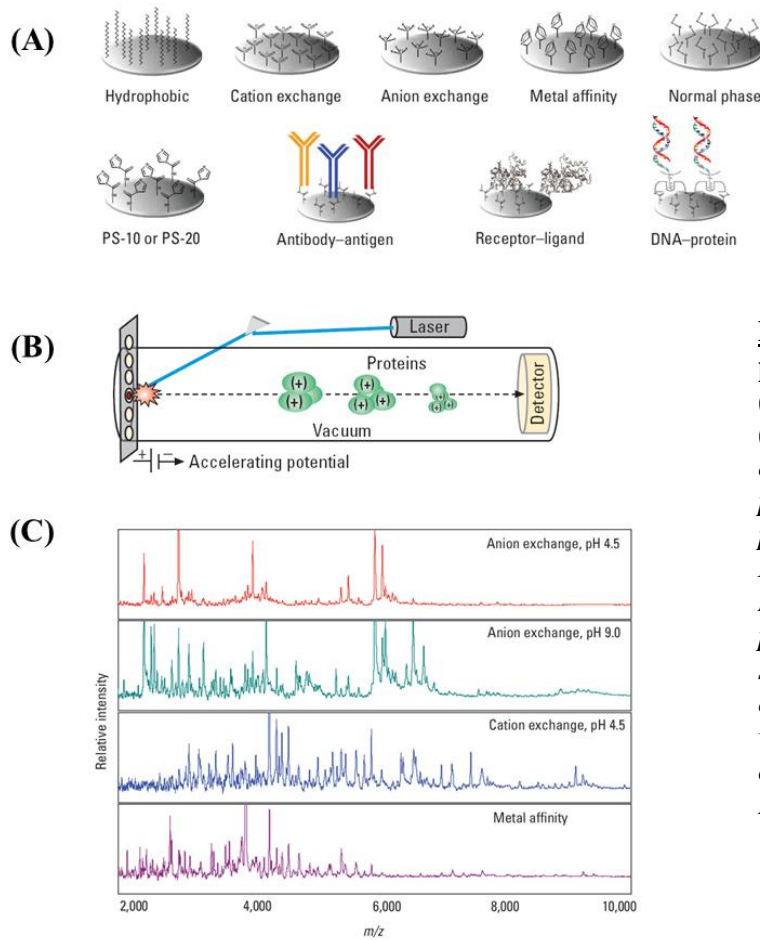


Figure 32 : Principe de l'analyse protéomique par SELDI-TOF MS.

(A) Les différents types de surface (chimiques, en haut, ou biochimique, en bas) constituant les puces à protéines. (B) Analyse des puces à protéines par spectrométrie de masse. Notez la similitude avec l'analyse par MALDI-TOF. (C) Exemples de profils protéiques obtenus après analyse de sérum humain sur des puces : échangeuse d'anions à différentes valeurs de pH, échangeuse de cations, ou de type IMAC. (d'après Issaq et al., 2003).

L'analyse par SELDI-TOF MS permet ainsi de générer très rapidement des profils protéiques à partir d'une faible quantité d'échantillon, de l'ordre de 1 μ l de sérum, ou de 25 à 50 cellules (Issaq et al., 2002 ; Issaq et al., 2003) ; de plus, cette méthodologie ne nécessite que peu d'étapes de purification ou de séparation avant l'analyse par spectrométrie de masse, limitant donc les étapes de préparation de l'échantillon protéique, souvent facteur de biais expérimental (De Bock et al., 2010). Cette méthodologie a ainsi été appliquée au profilage de différents types d'échantillons biologiques (sérum, sang, plasma, urine, salive, lysats cellulaires...) (De Bock et al., 2010), et été appliquée à l'étude des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN. Cette approche est une méthode complémentaire de l'électrophorèse bidimensionnelle système, particulièrement bien adaptée pour la visualisation des protéines de bas poids moléculaire (<15-20 kDa) (De Bock et al., 2010 ; Liu, 2011 ; Wright et al., 1999).

Cette méthodologie de « ProteinChip » a été utilisée pour la recherche de biomarqueurs pour différentes pathologies, notamment dans le domaine de l'oncologie (Seibert et al., 2005 ; Whelan et al., 2008a). Ainsi, le SELDI-TOF a conduit à l'identification de marqueurs pour le cancer de la prostate (Wright et al., 1999), de la vessie (Vlahou et al., 2001), du sein (Wulfkuhle et al., 2001), de l'ovaire (Zhang et al., 2004), le cancer colorectal (Chen et al., 2004), ou le carcinome épidermoïde (Seema et al., 2014) ; cette méthodologie a

également démontré son efficacité dans la recherche de biomarqueurs pour certaines maladies cardio-vasculaires, telles que l'insuffisance cardiaque (Pinet et al., 2008 ; Pinet, 2013).

1.3.3.2. Imagerie MALDI (MALDI-MSI ou MALDI-Mass Spectrometry Imaging).

L'imagerie par spectrométrie de masse permet de lier des informations moléculaires à la distribution spatiale d'analytes au sein d'un échantillon, et donne une nouvelle dimension au domaine de l'histologie et de la protéomique des tissus. En effet, l'imagerie MALDI permet l'analyse de centaines de composés de nature diverses (peptides, protéines, lipides, molécules pharmacologiques ou métabolites cellulaires (Aichler & Walch, 2015 ; Zaima et al., 2010)) sur des sections de tissus, sans marquage préalable. Cependant, elle reste associée avec l'histologie « classique » puisqu'elle permet la réalisation d'une cartographie directe de ces analytes (Longuespee et al., 2014). Le principe général de l'imagerie MALDI est représenté schématiquement figure 33.

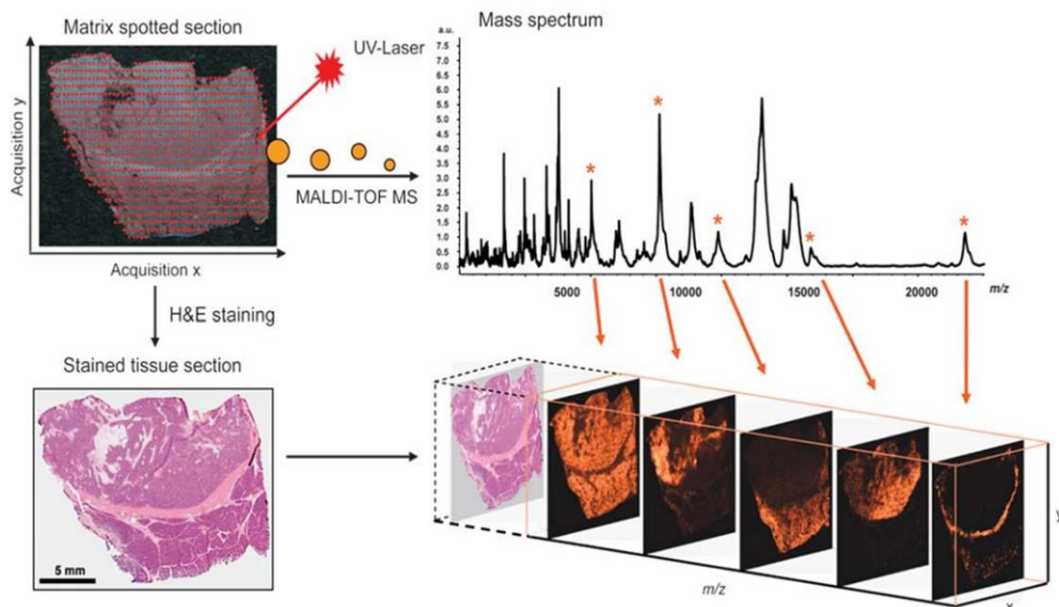


Figure 33 : Principe de l'analyse protéomique par MALDI-MSI (MALDI Mass Spectrometry Imaging). Une section « conventionnelle » de tissu déposée sur une lame conductrice est recouverte de matrice. Les données sont acquises par l'enregistrement de spectres de masse en différents points de la coupe, permettant de couvrir l'ensemble de la coupe de tissu. Les spectres de masse, enregistrés avec leurs coordonnées spatiales, sont traités de manière à générer des images traduisant la localisation des molécules au sein du tissu. (d'après Aichler & Walch, 2015).

La section de tissu, déposée sur une lame conductrice spécialement conçue pour l'imagerie MALDI, est recouverte de matrice afin de permettre la désorption et l'ionisation des analytes. Un faisceau laser va cibler une zone bien définie de l'échantillon, et conduire à la désorption de(s) analyte(s) ainsi que leur ionisation. Les ions résultants vont être transférés au spectromètre de masse et être analysés selon leur temps de vol. L'échantillon est ensuite déplacé, et la position suivante analysée de la même manière. Plusieurs milliers de spectres

sont acquis séquentiellement. Les images MS d'un analyte donné (correspondant donc à un pic m/z donné) sont générées après mesure de l'intensité des signaux du pic sélectionné dans les différentes zones de la coupe de tissu analysées. Ces images MS représentent donc la distribution spatiale de l'intensité d'un certain signal m/z (Franck et al., 2009 ; Rompp & Spengler, 2013).

Décrite il y a une vingtaine d'années (Caprioli et al., 1997 ; Spengler et al., 1994), l'imagerie MALDI s'est beaucoup améliorée en termes de vitesse d'analyse, de gamme de masse (Franck et al., 2010 ; van Remoortere et al., 2010), de résolutions spatiale et spectrale (Rompp & Spengler, 2013), d'imagerie ciblée (Longuespee et al., 2013 ; Stauber et al., 2010), ou encore de traitements de données (Bonnell et al., 2011 ; Jones et al., 2012). Il est ainsi possible de cartographier des analytes de masse moléculaire assez élevée (jusqu'à 25-30 kDa), et avec une résolution spatiale de l'ordre de 3 à 10 μm . Aujourd'hui incontournable dans le domaine de l'histologie moléculaire, l'imagerie MALDI est associée à un très large panel d'applications dans les domaines de la physiopathologie et de la pharmacologie (Aichler et al., 2013 ; El Ayed et al., 2010 ; McDonnell et al., 2010 ; Meding et al., 2012 ; Willems et al., 2010).

2. Cartographie du O-GlcNAcome dans le muscle squelettique.

Comme je l'ai spécifié précédemment, lorsque j'ai débuté mes travaux de recherche, il n'existait dans la bibliographie que très peu de données concernant le rôle de la O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique. Mes premiers travaux ont donc consisté en la réalisation d'une cartographie du O-GlcNAc protéome, ou O-GlcNAcome, du muscle strié squelettique ; ces résultats sont essentiellement issus de mes travaux de thèse. Les protéines extraites du gastrocnémien, purifiées par chromatographie d'affinité, ont ensuite été séparées par électrophorèse bidimensionnelle puis identifiées par spectrométrie de masse. La cartographie du O-GlcNAcome du muscle strié squelettique est représentée figure 34.

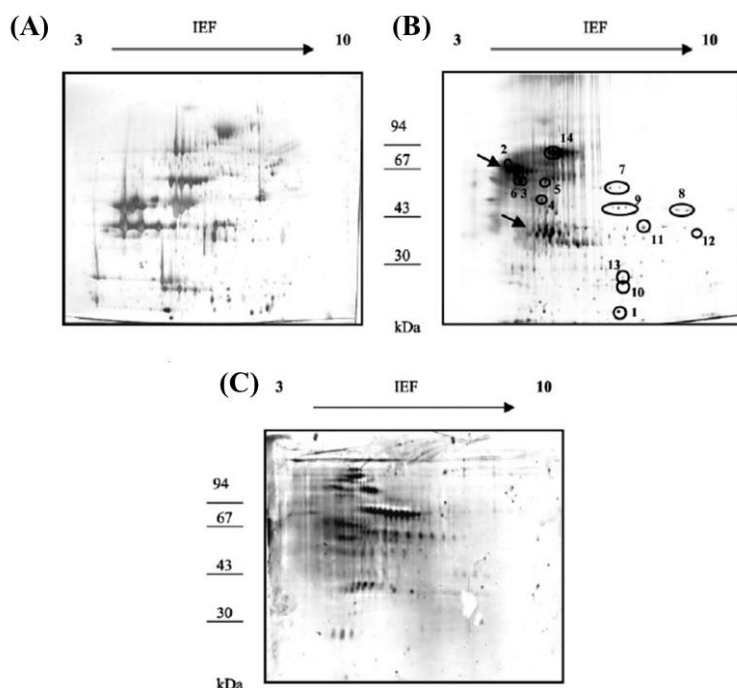


Figure 34 : Cartographie 2D-PAGE du O-GlcNAcome du muscle strié squelettique. La séparation a été effectuée sur une gamme de pH de 3 à 10, et la seconde dimension sur un gel à 10% de réticulation. (A) Extrait total coloré au nitrate d'argent. (B) O-GlcNAcome du muscle gastrocnémien après chromatographie sur colonne de WGA-immobilisée, coloré au nitrate d'argent. (C) Western blot d'un extrait de gastrocnémien détecté par la WGA-peroxydase.

Ces données nous ont révélées que de très nombreuses protéines du muscle squelettique sont modifiées par la O-GlcNAcylation, ce qui implique sans nul doute une part importante de cette modification post-traductionnelle dans la régulation de la fonctionnalité du muscle squelettique. Les protéines-O-GlcNAcylées identifiées au cours de cette étude, mais également lors d'études ultérieures (identification par spectrométrie de masse ou par une approche méthodologique ciblée, *i.e.* par immunoprécipitation suivie d'un western blot) sont indiquées dans le tableau IV. Je souligne le fait que dans ce tableau n'apparaissent pas les protéines récemment identifiées par une approche de Click Chemistry, approche qui nous a permis d'identifier 1644 protéines portant un motif O-GlcNAc ; ces travaux seront développés dans un paragraphe ultérieur.

Tableau IV : Protéines musculaires portant le motif O-GlcNAc identifiées au cours de nos différentes études. Ne sont concernées que des identifications par des approches expérimentales « classiques » (purification des protéines-O-GlcNAcylées puis identification par spectrométrie de masse), ainsi que les protéines identifiées par western blot après immunoprécipitation (en italique dans le tableau).

Classes de protéines	Protéines identifiées comme O-GlcNAcylées	
PROTEINES SARCOMERIQUES (CONTRACTILES ET STRUCTURALES)	Chaîne lourde de myosine Actine MLC1 MLC2 <i>Troponine T</i> <i>Troponine I</i>	Tropomyosine Actinine Desmine α B-cristalline <i>BAG3</i> <i>Filamine C</i>
PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA TRANSDUCTION DU SIGNAL	Phosphoinositide-3-kinase, p85 MAP kinase kinase kinase 8	Protéine phosphatase 2A
ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA GLYCOLYSE ET LE METABOLISME ENERGETIQUE	β -énolase Fructose-bisphosphatase aldolase Triose phosphate isomérase Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase Glycogène phosphorylase Lactate déshydrogénase	Créatine kinase Adénylate kinase (myokinase) Anhydrase carbonique III ATP synthase, chaîne β Aconitase mitochondriale Malate déshydrogénase (cytosolique et mitochondriale)
AUTRES	Anhydrase carbonique III Inhibiteur III de la sérine protéase	Phosphatidyl ethanolamine binding protein

Par ces méthodes que je qualifierai de « classiques », nous avons ainsi identifié un certain nombre de protéines modifiées par la O-GlcNAcylation dans le muscle squelettique. Ces protéines appartiennent à différentes voies métaboliques de la cellule musculaire, telles que la glycolyse aérobie et anaérobie, des enzymes impliquées dans la navette malate-oxaloacétate entre le cytosol et la mitochondrie, des protéines impliquées dans les mécanismes de régénération rapide de l'ATP (notamment la créatine kinase ou la myokinase), des protéines mitochondriales, ou encore des protéines de la signalisation intracellulaire (Cieniewski-Bernard et al., 2004)... Enfin, nous avons identifié de nombreuses protéines contractiles, motrices et régulatrices de la contraction, ainsi que de multiples protéines structurales (Cieniewski-Bernard et al., 2004 ; Cieniewski-Bernard et al., 2012 ; Hedou et al.,

2007). Il est à noter que pour les protéines contractiles (MHC) ou régulatrices (TnT, TnI) du myofilament, les isoformes lentes et rapides sont glycosylées.

3. Analyse protéomique différentielle dans le myocarde : vers la caractérisation de marqueurs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus.

Après ma thèse, j'ai souhaité approfondir mes connaissances en physiologie du muscle strié, mais aussi développer mes compétences dans le domaine de la protéomique, plus particulièrement l'analyse protéomique différentielle. En effet, bien qu'ayant acquis de bonnes bases pour la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle et l'identification des protéines par spectrométrie de masse au cours de ma thèse, je n'avais pas encore acquis de compétences dans l'analyse différentielle. Pour cela, j'ai intégré l'équipe du Dr Florence PINET au sein de l'unité INSERM U744 Epidémiologie de Santé Publique à l'Institut Pasteur de Lille, équipe internationalement reconnue dans les domaines de la physiologie cardiovasculaire et de l'analyse protéomique. L'objectif de ce projet, effectué en étroite collaboration avec les Dr Vincent RICHARD et Paul MULDER à l'Unité INSERM U644 Pharmacologie de l'adaptation endothéliale et de la dysfonction myocardique (Rouen), était de caractériser des marqueurs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus.

3.1. Revue de littérature : le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus.

L'avancée des traitements et l'augmentation de l'espérance de vie des populations font que de plus en plus d'individus survivent après un infarctus. Malgré les succès indéniables de la thrombolyse, tant en terme de limitation des dégâts imposés au muscle cardiaque, de réduction de la taille de l'infarctus que de préservation à long terme de la fonction ventriculaire, un certain nombre de patients développe néanmoins une nécrose transmurale conduisant au remplacement du tissu cicatriciel viable par une cicatrice fibreuse. Ces modifications architecturales constituent la base des altérations de la géométrie du ventricule gauche qui surviennent à la phase de convalescence d'un infarctus et que l'on regroupe sous le terme de remodelage ventriculaire (St John & Scott, 2002). Ces modifications concernent à la fois le muscle infarci et les zones normales, non ischémiques, du ventricule gauche (VG). Leur évolution est progressive dans le temps, et leur sévérité dépend de la taille de l'infarctus, du temps écoulé depuis l'infarctus, de la localisation de l'infarctus ainsi que de la perméabilité de l'artère responsable de l'infarctus.

Le remodelage ventriculaire s'établit selon deux phases (figure 35). La phase précoce, qui survient dans un laps de temps s'étendant de quelques jours à quelques semaines après l'infarctus, consiste en l'expansion de la zone infarctée (Erlebacher et al., 1984). Elle se caractérise par une série de modifications structurelles, comprenant la dilatation et l'amincissement de la zone d'infarctus. A plus long terme (mois-années), des changements structuraux vont également survenir dans la zone non infarctée, sous forme d'hypertrophie excentrique du VG (Pfeffer & Braunwald, 1990). La dilatation du VG peut être considérée à court terme comme un mécanisme protecteur visant à maintenir le débit systolique et la

fonction pompe du ventricule gauche, mais cependant, à plus long terme, sa dilatation et les modifications structurelles qui l'accompagnent ont des effets délétères. Ce remodelage est insidieux et conduit *in fine* à la dilatation et à l'altération de la fonction globale du ventricule gauche, de même qu'à l'apparition de signes d'insuffisance cardiaque (IC).

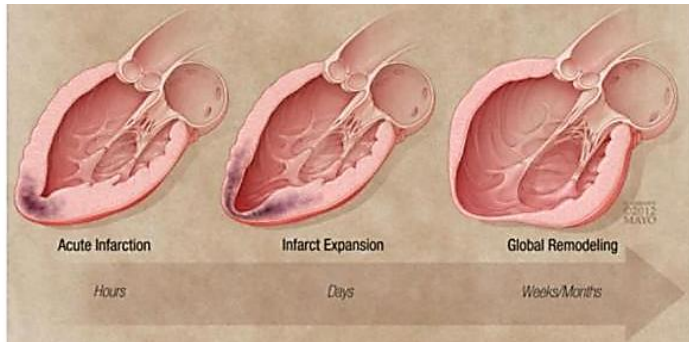


Figure 35 : Remodelage ventriculaire gauche post-infarctus. Ce schéma représente le modèle conventionnel de remodelage du ventricule gauche consécutif à un infarctus du myocarde (d'après Dunlay & Roger, 2012).

Bien que certaines protéines modulées dans l'IC étaient utilisées comme facteur de mauvais pronostic, aucune étude n'avait recherché de manière systématique, en utilisant des techniques de protéomique, d'autres protéines sériques et tissulaires modulées dans l'IC, pouvant constituer de bons marqueurs diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques (Arrell et al., 2001 ; Cieniewski-Bernard et al., 2008a ; Dubois et al., 2011a ; Loscalzo, 2003). Ainsi, l'identification par analyse protéomique différentielle de marqueurs sériques et tissulaires du remodelage ventriculaire post-infarctus dans un modèle expérimental d'IC pouvait permettre de corréliser les changements observés au niveau du protéome cardiaque avec les changements fonctionnels et structuraux du myocarde observés dans l'IC, et de comparer les marqueurs sériques par rapport aux marqueurs tissulaires. L'objectif était de mieux appréhender les mécanismes cellulaires mis en jeu dans le remodelage ventriculaire post-infarctus afin de pouvoir définir de nouvelles cibles thérapeutiques capables de ralentir voire stopper le remodelage ventriculaire post-infarctus.

3.2. Identification de marqueurs du remodelage ventriculaire dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque : analyse par 2D-PAGE.

Les modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque ont été développés à l'INSERM U644 Pharmacologie de l'adaptation endothéliale et de la dysfonction cardiaque (Derumeaux et al., 2002), par induction d'un infarctus du myocarde chez le rat mâles de souche Wistar. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps suivant la ligature de la coronaire : sept jours et deux mois, correspondant à la phase précoce et tardive du remodelage ventriculaire, respectivement. L'évaluation de la fonction cardiaque de chacun des animaux témoins et IC avait été réalisé par échocardiographie transthoracique Doppler et mesure des paramètres hémodynamiques, permettant de déterminer le degré d'insuffisance cardiaque et le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche. Afin de caractériser les protéines du ventricule gauche exprimées différemment lors du remodelage ventriculaire post-infarctus, nous avons réalisé une analyse protéomique différentielle par 2D-PAGE afin de comparer le protéome du VG d'animaux témoins et d'animaux IC. La figure 36A représente un gel bidimensionnel représentatif du protéome total de VG d'un animal IC, sur lequel les

spots différentiels entre les animaux témoins et IC ont été indiqués. Nous avons identifié par spectrométrie de masse 41 spots, correspondant à 27 protéines différentes, et réalisé une analyse par Western blot sur 16 d'entre elles afin de valider leur niveau de modulation. Les protéines identifiées, marqueurs biologiques du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus, appartiennent à des classes variées de protéines, comme indiquées figure 36B, telles que des protéines structurales, des protéines de choc thermique, des protéines impliquées dans la protection contre le stress, de nombreuses protéines du métabolisme énergétique (glycolyse, cycle de Krebs, métabolisme des acides gras, synthèse d'ATP), et enfin des protéines de la voie des kinines (Cieniewski-Bernard et al., 2008b).

Dans cette étude, nous avons corrélié les changements du protéome cardiaque avec

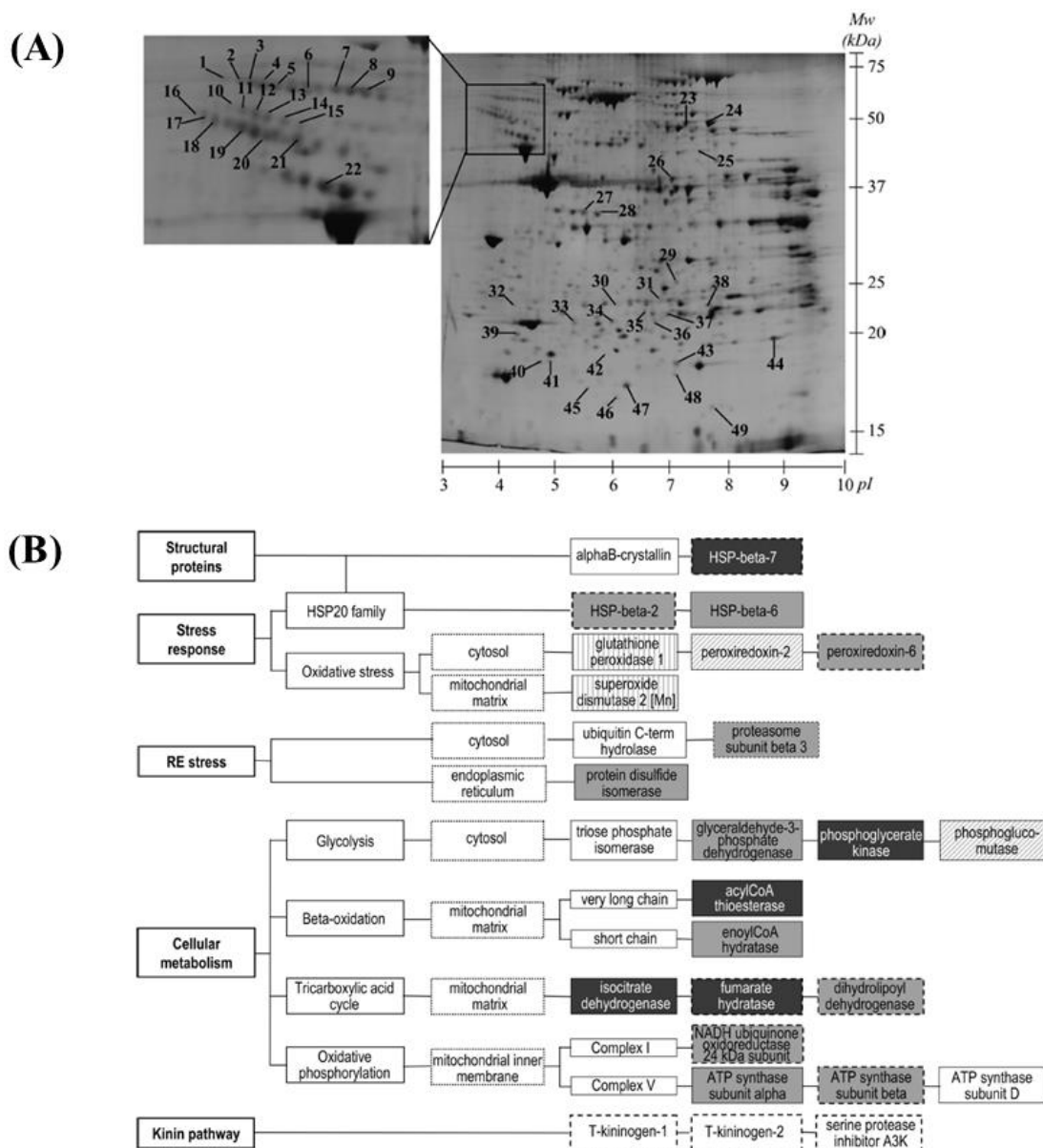


Figure 36 : Caractérisation de marqueurs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque. (A) Cartographie représentative des protéines du VG ; les protéines numérotées correspondent aux protéines exprimées différemment lors du remodelage ventriculaire. (B) Classification des protéines exprimées différemment selon leur fonction cellulaire, leur localisation et leur modulation lors de la phase précoce ou tardive du remodelage ventriculaire. (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2008b).

différents mécanismes impliqués dans le développement de l'insuffisance cardiaque post-infarctus, notamment le métabolisme énergétique et le stress oxydatif. Certaines protéines étaient modulées lors de la phase précoce du remodelage ventriculaire (*i.e.* peroxyredoxine-2), tandis que d'autres protéines constituaient des marqueurs tardifs de ce remodelage ventriculaire post-infarctus (*i.e.* protéine disulfide isomérase). De manière intéressante, **certaines de ces protéines étaient différemment modulées chez les animaux IC classés selon la sévérité de leur insuffisance cardiaque, suggérant donc des voies d'adaptation différentes.** Nous avons également mis en évidence **certaines protéines dont la modulation était corrélée à la sévérité de l'insuffisance cardiaque** (figure 37), pouvant être des candidats prometteurs comme marqueurs ou médiateurs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus et de la dysfonction cardiaque.

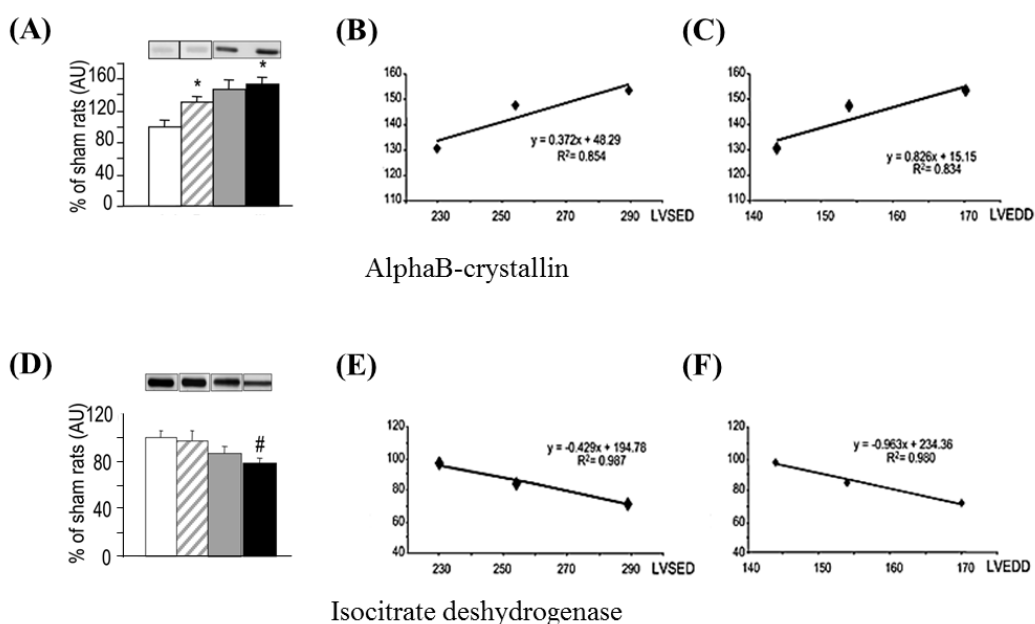


Figure 37 : Variation d'expression de l'αB-cristalline et de l'isocitrate déshydrogénase selon la sévérité de l'insuffisance cardiaque. (A, D) Variation d'expression de l'αB-cristalline (en A) et de l'isocitrate déshydrogénase (en D) chez les rats 7-jours post-infarctus (en hachuré), ou deux mois post-infarctus (en gris et en noir), l'IC la plus sévère étant indiquée en noir. (B, E) Corrélation entre la variation d'expression de l'αB-cristalline (en B) et de l'isocitrate déshydrogénase (en E) et le diamètre du ventricule gauche en fin de systole (LVESD). (C, F) Corrélation entre la variation d'expression de l'αB-cristalline (en C) et de l'isocitrate déshydrogénase (en F) et le diamètre du ventricule gauche en fin de diastole (LVEDD). (modifiée d'après Cieniewski-Bernard et al., 2008b).

4. Développement méthodologique : 2D-PAGE multiplex pour l'analyse du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome total.

Il est aujourd'hui essentiel d'accéder au pattern et à la quantification de la variation de O-GlcNAcylation afin de mieux comprendre le rôle de cette modification post-traductionnelle, fondamentale à la vie cellulaire, dans la régulation de la physiologie cellulaire. L'un des challenges pour la communauté des protéomistes/glycoprotéomistes est d'accéder de manière relativement aisée à la O-GlcNAcylation des protéines, tout en pouvant

analyser dans le même temps sa dynamique avec la phosphorylation.

Nous avons développé une méthodologie basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle afin de pouvoir identifier sans *a priori* des protéines présentant une modulation de leur taux de phosphorylation, et/ou de O-GlcNAcylation, et/ou de leur expression. Cette méthodologie a été développée dans le cadre d'un projet de recherche supporté par la région Nord-Pas-de-Calais, et pour lequel j'étais coordinatrice (programme Projets émergents, « Rôle de la O-GlcNAcylation dans la structuration du sarcomère et sa réorganisation au cours de pathologies musculaires »), et publiée en 2014 (Cieniewski-Bernard et al., 2014a). Après la mise en place de cette méthode, j'ai encadré deux étudiants, Paul DUHAMEL (M1 Génomique et Protéomique), et François-Xavier BARBIER (M1 Biologie et Biotechnologies, parcours Biologie Structurale et Moléculaire), qui ont intégré le laboratoire pour des stages d'une durée de 4 mois et de 4 semaines, respectivement. Leur tâche était d'appliquer cette méthodologie aux protéines myofilamentaires de myotubes de type C2C12 pour le développement d'un projet de recherche que je détaillerai dans la partie « Projet de recherche » de ce mémoire.

4.1. Revue de littérature : les différentes méthodes pour l'étude et la détection du O-GlcNAcome.

4.1.1. Problématique.

Tout comme d'autres modifications post-traductionnelles, la O-GlcNAcylation est dynamique, réversible, substœchiométrique, spécifique du compartiment, du type et de l'état de la cellule. L'absence d'une charge propre au motif O-GlcNAc, ainsi que la taille négligeable du monosaccharide, ne modifie pas le pattern électrophorétique de la protéine (Banerjee et al., 2013). De plus, la liaison entre le monosaccharide et la protéine est faible, ce qui rend la liaison très labile en spectrométrie de masse. On observe également la suppression d'ions entre le peptide glycosylé et le peptide non modifié, ce qui rend son « observation » difficile en spectrométrie de masse. Enfin, en l'absence d'inhibiteurs, les hexosaminidases hydrolysent aisément le monosaccharide lors des processus d'extraction (Banerjee et al., 2013). Ces différentes raisons font que la O-GlcNAcylation, malgré son importance biologique, n'a été détectée que tardivement. Ce sont également les raisons pour lesquelles l'étude de la O-GlcNAcylation est parfois (très) difficile pour certaines protéines (faiblement exprimées et/ou glycosylées). Dans le paragraphe suivant, j'ai comparé les différentes méthodes de détection et de purification des protéines O-GlcNAcylées ; j'ai également détaillé la méthodologie de « Click Chemistry », puisque cette approche expérimentale est et sera appliquée à différents projets de recherche comme nous le verrons dans la suite de ce mémoire.

4.1.2. Méthodes classiques de détection et/ou de purification des protéines-O-GlcNAcylées.

L'une des méthodes les plus anciennes, et parmi les plus utilisées, est la détection du motif glycosylé par l'utilisation de lectines, capables de reconnaître et de se fixer sur des motifs glycosylés. La WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) est une lectine couramment utilisée

pour la détection du motif O-GlcNAc, notamment sous sa forme succinylée (sWGA, succinylated WGA). La sWGA présente l'avantage d'être chargée négativement à pH physiologique, perdant par là-même sa spécificité pour les acides sialiques pour reconnaître exclusivement les résidus de GlcNAc liés en β sur les protéines ; la WGA est également utilisée lors de la purification des protéines O-GlcNAcylées. Une autre méthode couramment utilisée pour détecter les changements de O-GlcNAcylation est l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre le motif GlcNAc. Différents anticorps sont aujourd'hui disponibles, en particulier le RL-2 ou le CTD110.6 (Ma & Hart, 2014 ; Zachara et al., 2011), permettant la détection et/ou l'enrichissement des protéines-O-GlcNAcylées.

Cependant, il n'existe que très peu d'anticorps dirigés contre les formes O-GlcNAcylées des protéines, contrairement à ce que l'on peut rencontrer pour les protéines phosphorylées. Ainsi, afin de quantifier la variation de O-GlcNAcylation sur une protéine d'intérêt, les protéines O-GlcNAcylées sont immunoprécipitées, ou purifiées par chromatographie d'affinité, puis la(les) protéine(s) d'intérêt est(ont) détectée(s) par western blot. Cette méthode est particulièrement bien adaptée pour une approche ciblée, sur une protéine donnée (ou un nombre restreint de protéines), ce qui en constitue la principale limitation. Il y a également une limitation en terme de sensibilité, puisque les protéines faiblement exprimées, et/ou faiblement glycosylées, ne sont pas reconnues comparativement aux protéines fortement exprimées et/ou fortement glycosylées.

4.1.3. « Etiquetage » des protéines O-GlcNAcylées et la Click Chemistry.

4.1.3.1. Principe général du marquage par le substrat (« tagging via substrate »).

Depuis quelques années a été développée une nouvelle stratégie destinée à l'étude des modifications co- et post-traductionnelles. En effet, l'identification et la caractérisation de ces modifications est un réel challenge pour la compréhension de la fonctionnalité des protéines. L'idée est d'introduire des petites molécules de marquage sur les protéines, spécifiques de la modification post-traductionnelle, n'interférant pas avec le métabolisme cellulaire, et pouvant être prises en charge par des enzymes endogènes ou exogènes (Heal & Tate, 2010).

Ce marquage d'une cible protéique par l'intermédiaire d'une petite molécule, plus spécifiquement au niveau d'un site modifié, est commun aux différentes approches protéomiques pour l'étude des modifications post-traductionnelles. Un analogue d'un substrat naturel d'une enzyme catalysant le transfert d'une modification post-traductionnelle (*e.g.* une transférase) va être transféré sur une protéine cible. Un tag va marquer l'analogue du substrat naturel ; ce tag doit être biologiquement inerte pour la cellule, permettant au substrat marqué d'être pris en charge par la machinerie cellulaire. Des réactions *in vitro* peuvent également être envisagées par l'utilisation d'enzymes recombinantes, enzymes modifiées pour tolérer l'analogue marqué. Une fois la protéine marquée, une réaction sélective de ligation biorthogonale est réalisée entre le tag et une autre entité chimique (ou réactif de capture), portant elle-même un autre marqueur (marqueur secondaire). Le principe du marquage-couplage est représenté schématiquement figure 38. Dans la plupart des études, cette étape est basée sur la Click Chemistry, très sélective dans un environnement biologique, et compatible

dans un environnement aqueux. Les réactifs de capture sont extrêmement variés, ce qui nous offre une multitude d'outils d'enrichissement par affinité (biotine, tag histidine, peptides FLAG...), de détection (fluorophores), ou de quantification (radiomarqueurs, isotopes stables) (Heal & Tate, 2010).

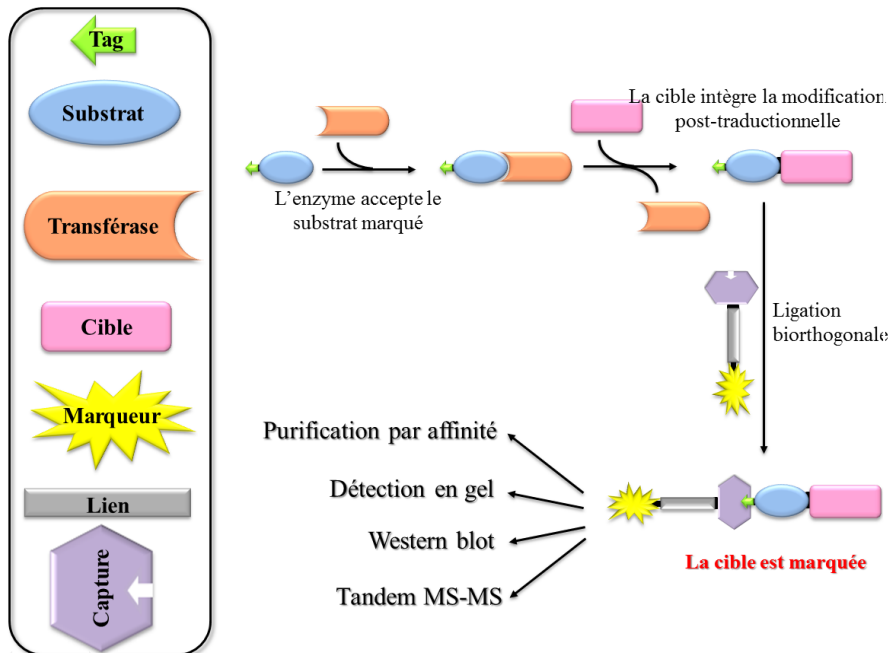


Figure 38 : Représentation schématique de la technique du « marquage par le substrat ». La transférase peut médier des réactions de transfert (marquage) *in vivo* ou *in vitro*. Les réactions de couplage en aval sont dédiées à la purification, à la détection, et/ou à la quantification de la protéine cible. (modifié d'après Heal & Tate, 2010)

Cette approche de « marquage par le substrat » peut être appliquée à l'étude de nombreuses modifications post-traductionnelles : acylation, myristoylation, palmitoylation... Concernant la glycosylation, le groupe de Carolyn Bertozzi a été précurseur pour l'utilisation de dérivés azides de monosaccharides, pris en charge par la machinerie cellulaire pour la synthèse de glycannes (Agard et al., 2004 ; Agard et al., 2006 ; Prescher & Bertozzi, 2005 ; Prescher & Bertozzi, 2006 ; Saxon & Bertozzi, 2000 ; Saxon & Bertozzi, 2001). L'équipe de Linda Hsieh-Wilson s'est focalisée quant à elle sur l'étude de la O-GlcNAcylation ; les travaux réalisés par cette équipe, présentés ci-dessous, ont permis une avancée majeure dans la détection, la purification et l'identification des protéines O-GlcNAcylées.

4.1.3.2. Marquage métabolique des protéines O-GlcNAcylées.

Il y a une dizaine d'années, David Vocadlo a appliqué cette approche de « marquage par le substrat » à l'étude de la O-GlcNAcylation (Vocadlo et al., 2003). En permettant de s'affranchir des étapes de marquages *in vitro*, le marquage métabolique offre la possibilité d'incorporer la fonction azide directement au niveau des protéines O-GlcNAcylées. Dans cette approche, un analogue de la GlcNAc, la N-azido-acétylglucosamine (GlcNAz) sera incorporé *in cellulo* au niveau des protéines O-GlcNAcylées (figure 39). En effet, la cellule est capable de métaboliser des sucres non naturels. Ainsi, la GlcNAz peracétylée (Ac₄GlcNAz), ajoutée au milieu de culture, va pouvoir entrer dans la cellule, et être rapidement convertie en GlcNAz par action de déacétylases endogènes (Banerjee et al., 2013 ; Kim, 2011 ; Ma & Hart, 2014). La GlcNAz va entrer dans la voie de biosynthèse des hexosamines, pour être convertie en UDP-GlcNAz, qui pourra alors servir de substrat à

l'OGT, et être incorporé au niveau des protéines devant être O-GlcNAcylées.

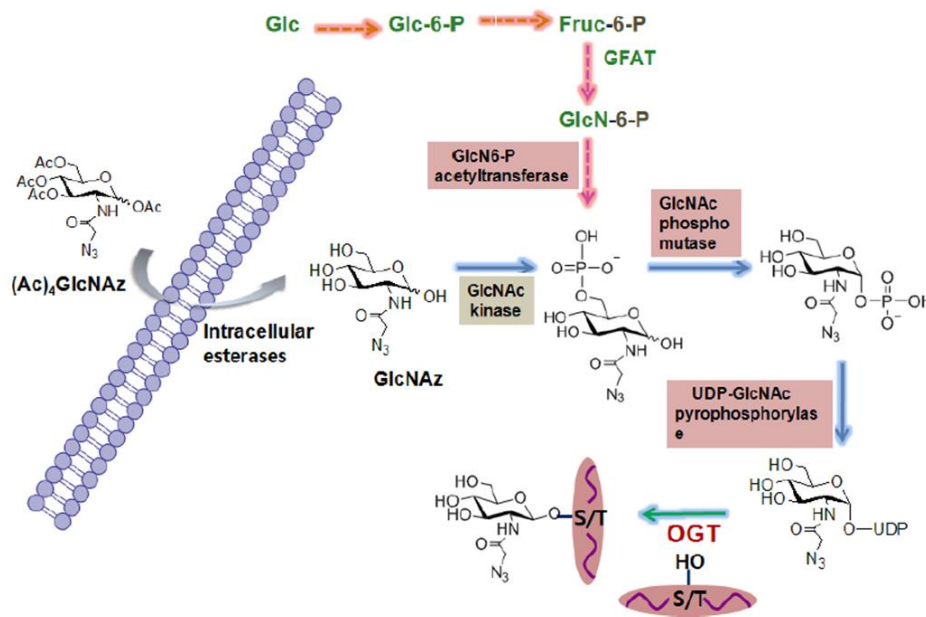


Figure 39 : Marquage métabolique des protéines par la GlcNAz. L'*Ac*₄GlcNAz va entrer dans la cellule pour servir de substrat aux différentes enzymes de la voie de biosynthèse des hexosamines. L'UDP-GlcNAz ainsi formé va servir de substrat à l'OGT pour être transféré aux protéines devant être O-GlcNAcylées. (d'après Kim, 2011).

D'autres dérivés de la GlcNAc ont par la suite été développés (Gurcel et al., 2008 ; Zaro et al., 2011 ; Zaro et al., 2014). Le groupement réactif azide peut alors servir de site accepteur pour des tags d'enrichissement (notamment des phosphines biotinyllées) par l'intermédiaire de la ligature de Staudinger (Nandi et al., 2006 ; Sprung et al., 2005 ; Vocadlo et al., 2003). Cependant, l'un des inconvénients majeurs de cette approche est la compétition entre l'UDP-GlcNAz et le substrat naturel, l'UDP-GlcNAc, dans la mesure où les enzymes de la machinerie cellulaire utilisent les substrats naturels avec une meilleure efficacité (Hu et al., 2010). Je développerai dans le paragraphe suivant les stratégies de couplage en aval pour la détection et la purification des protéines, identiques quels que soient les marquages envisagés (*in vivo* ou *in vitro*).

4.1.3.3. Marquage *in vitro* des protéines-O-GlcNAcylées.

Une méthode, utilisée originellement par Hart, consiste en un marquage spécifique des résidus terminaux de GlcNAc par l'intermédiaire de la β -1,4-galactosyltransférase (GalT) (Torres & Hart, 1984). Cette enzyme catalyse le transfert d'un résidu de galactose à partir du donneur UDP-Gal, sur les résidus GlcNAc terminaux, indépendamment de la séquence peptidique environnante (Ramakrishnan & Qasba, 2002). Le transfert de résidus de galactose tritié permet la détection des protéines O-GlcNAcylées par autoradiographie (Roquemore et al., 1994). Cette stratégie de marquage spécifique du motif O-GlcNAc par l'intermédiaire d'un résidu de galactose pouvait également permettre en aval une détection et/ou purification des protéines O-GlcNAcylées par l'intermédiaire de la lectine RCA (*Ricinus communis Agglutinin*), qui reconnaît le motif disaccharidique β -Gal-1,4-GlcNAc, comme représenté

figure 40 (Zachara, 2009).

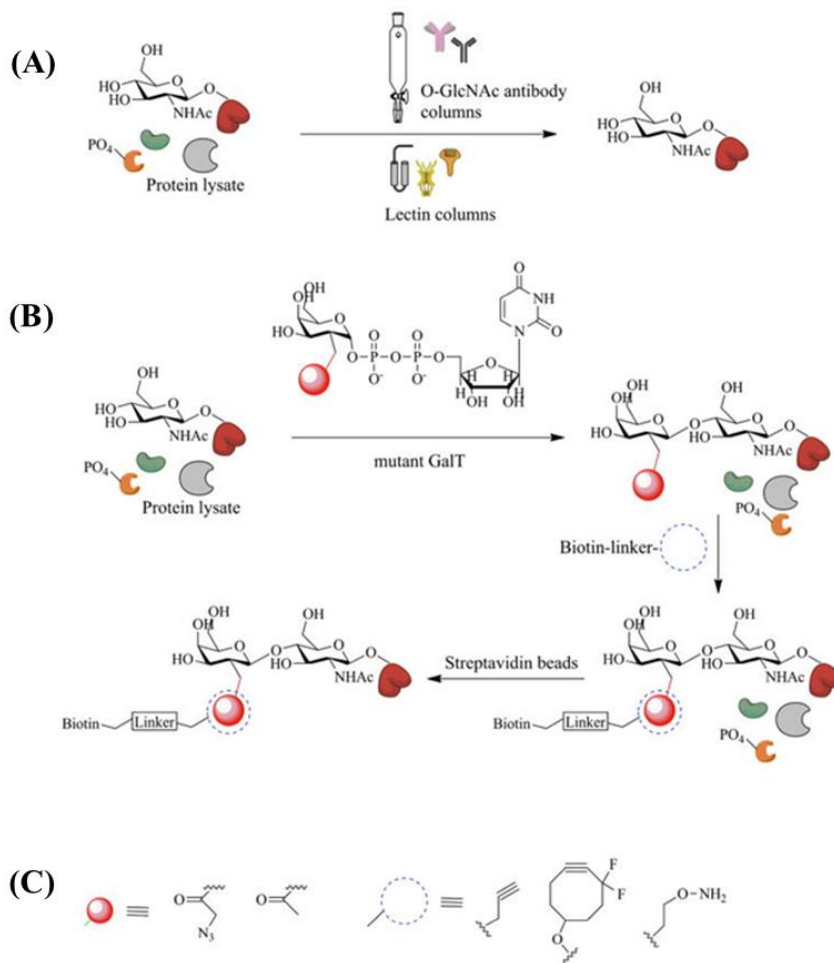


Figure 40 : Stratégies d'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées. (A) Méthode classique de purification des protéines portant un motif O-GlcNAc basée sur l'utilisation d'anticorps ou de lectines. (B) Méthode chimio-enzymatique basée sur l'utilisation de la galactosyltransférase mutée, permettant le transfert d'un analogue du galactose portant un groupement chimique réactif sur les résidus O-GlcNAc. (C) Couplage entre le groupement réactif porté par le galactose et des sondes permettant la détection et/ou l'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées.

Il y a une dizaine d'année a été développé dans l'équipe de Linda Hsieh-Wilson un mutant de la galactosyl transférase (mutant GalT^{Y289L} sur la figure 40B) tolérant vis-à-vis de dérivés de l'UDP-Gal (Khidekel et al., 2003). Cette nouvelle stratégie permettait le transfert sélectif d'une fonction cétone non naturelle, biologiquement inerte, sur les protéines O-GlcNAcylées. Ainsi, à l'origine, le galactose était dérivé par un groupement cétone, servant de tag inerte pour le couplage avec une sonde aminoxy-biotine (figure 40C) (Tai et al., 2004). Les protéines O-GlcNAcylées pouvaient ainsi être rapidement et avec une très bonne sensibilité détectées et/ou purifiées en aval grâce à l'interaction streptavidine-biotine. Les auteurs ont mis en évidence que des protéines O-GlcNAcylées pouvaient ainsi être détectées en quelques minutes, alors que 1000h d'exposition étaient nécessaires pour la détection par autoradiographie (Tai et al., 2004) ; ils ont également démontré que cette nouvelle approche méthodologique pouvait être appliquée à l'identification de sites de O-GlcNAcylation. Par la suite, l'équipe a mis en place une méthode pour quantifier la stœchiométrie de la O-GlcNAcylation, et notamment discriminer les formes mono-, di-, tri-glycosylées d'une protéine donnée, en couplant des dérivés du polyéthylène glycol, constituant ainsi un PEG-Tag (Clark et al., 2013 ; Rexach et al., 2010).

La même équipe a ensuite envisagé de marquer les protéines par un fluorophore, l'idée

étant de détecter les protéines par fluorescence, directement en gel, mais également par immunofluorescence après marquage cellulaire. Cependant, il s'est avéré que le marquage d'un lysat cellulaire par un dérivé de la fluorescéine (aminoxy fluorescéine) conduisait à un marquage aspécifique assez important au niveau des protéines du lysat (Clark et al., 2008). La méthode initiale de transfert d'un dérivé cétone a donc rapidement été modifiée en vue de l'incorporation d'une fonction azide, biologiquement inerte, au niveau des protéines O-GlcNAcylées. Après le transfert de l'azido-N-acétyl-galactosamine (GalNAz) par la GalT^{Y289L}, les protéines O-GlcNAcylées, ainsi marquées par la fonction azide, sont couplées par un dérivé-alkyne par cycloaddition [3+2] en présence de cuivre : c'est la Click Chemistry. Les auteurs ont couplés aux protéines glycosylées l'alkyne-tétra-méthyl-6-carboxyrhodamine (alkyne-TAMRA), les protéines ainsi marquées étant séparées par SDS-PAGE (voir figure 41A) ; cependant, la détection est très faible. Les protéines marquées au TAMRA ont alors été immunoprécipitées puis séparées par SDS-PAGE par l'intermédiaire d'un anticorps anti-TAMRA, permettant ainsi d'enrichir les protéines O-GlcNAcylées, et donc de les visualiser plus facilement. Cette stratégie offre l'avantage de pouvoir également être appliquée aux gels bidimensionnels (figure 41A-B). Cependant, l'inconvénient majeur reste l'immunoprécipitation des protéines préalablement à leur séparation électrophorétique (Clark et al., 2008) ; de plus, suite au marquage puis à l'enrichissement des protéines marquées au TAMRA, on peut observer une intensité relativement importante des signaux, ne semblant pas compatible avec une analyse protéomique différentielle. Cette méthode est compatible avec une analyse par spectrométrie de masse en aval, mais également au marquage de cellules par immunofluorescence (figure 41C) (Clark et al., 2008).

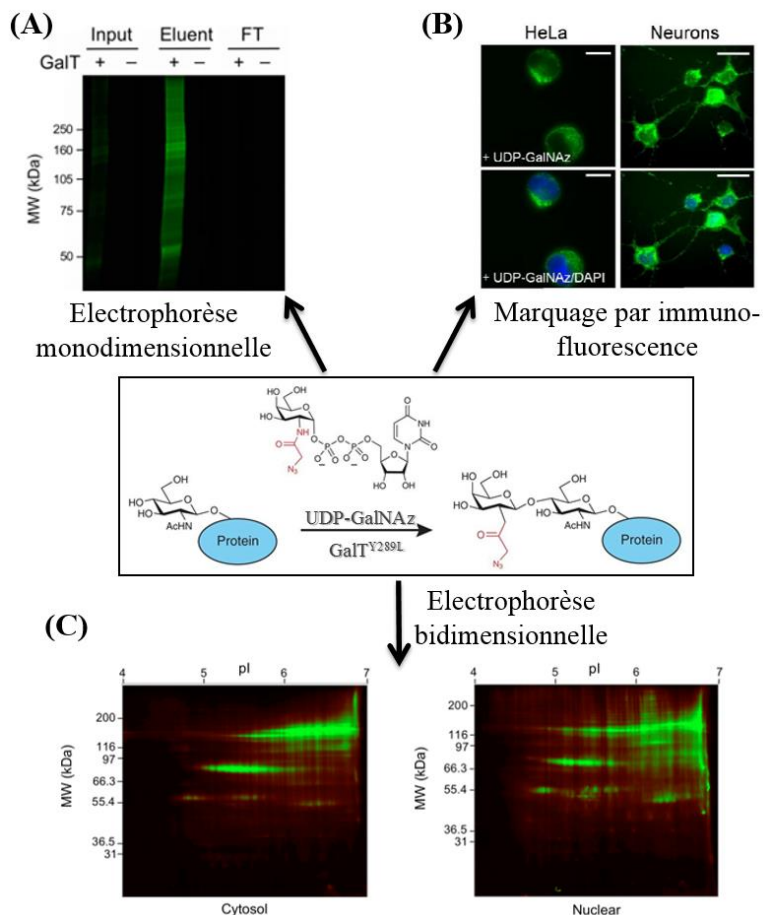


Figure 41 : Détection par fluorescence des protéines O-GlcNAcylées par la Click Chemistry, après transfert spécifique de GalNAz sur les protéines O-GlcNAcylées par la GalT^{Y289L}. (A) Détection directe de la fluorescence après séparation électrophorétique de 15 µg de protéines marquées (Input) ou après enrichissement des protéines marquées à partir de 470 µg de protéines (Eluent). FT : fraction non retenue. (B) Détection des protéines O-GlcNAcylées de cellules HeLa ou de neurones par immunofluorescence. (C) Détection de protéines cytosoliques et nucléaires extraites de cerveau de rat adulte, marquées au TAMRA, immunoprécipitées puis séparées par électrophorèse bidimensionnelle. (modifiée d'après Clark et al., 2008 ; Rexach et al., 2010).

Il est important de souligner que les réactifs de marquage, qu'il s'agisse du marquage métabolique, ou du marquage enzymatique *in vitro*, et de couplage (avec la biotine ou avec la TAMRA) sont aujourd'hui commercialisés (Molecular Probes), et c'est sur cette base que nous avons entrepris de mettre en place notre stratégie d'analyse protéomique multiplex.

4.2. Détection du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome global à partir d'un seul et même gel.

4.2.1. Problématique.

Afin de mieux comprendre la dynamique de O-GlcNAcylation lors des changements d'état des cellules ou des tissus, qu'il s'agisse de changements physiologiques ou physiopathologiques, l'analyse protéomique par gels 2D reste une approche méthodologique de choix pour quantifier les variations de O-GlcNAcylation des protéines. Bien que remise en question avec l'avènement de la spectrométrie de masse, et malgré les limitations inhérentes propres à l'électrophorèse bidimensionnelle (dextérité et reproductibilité, analyse des protéines membranaires, diversité des protéines...) (Fey & Larsen, 2001 ; Rabilloud, 2002), cette méthode présente l'avantage majeur de cartographier un protéome à un instant donné, et dans des conditions physiologiques particulières, et d'avoir une vision globale de « l'activité cellulaire », mais également d'analyser les modifications des protéines (Fey & Larsen, 2001 ; Rogowska-Wrzesinska et al., 2013).

Des cartographies du O-GlcNAcome ont ainsi été réalisées avec succès à partir d'une stratégie basée sur l'utilisation des gels-2D. Les protéines d'un échantillon biologique sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle, et les protéines O-GlcNAcylées ont été détectées après transfert sur membrane par l'utilisation d'anticorps ou de lectines comme nous l'avons vu précédemment. Il avait alors été possible d'identifier les protéines O-GlcNAcylées, mais aussi celles présentant une variation de leur taux de O-GlcNAcylation (Champattanachai et al., 2013 ; Cieniewski-Bernard et al., 2004 ; Drougat et al., 2012 ; Park et al., 2007). Toujours sur la base d'une détection par western blot, cette approche peut être couplée à la détection du phosphoprotéome (Gu et al., 2011). La difficulté majeure, mais non des moindres, de ce type d'approche est l'alignement entre les western blot bidimensionnels et les gels correspondant colorés au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie par l'utilisation de logiciels d'analyse d'images. Pour s'affranchir de ce problème, certaines équipes ont envisagées une approche multiplex, basée sur l'utilisation de colorants fluorescents, afin de détecter la O-GlcNAcylation (par l'intermédiaire du ProQ Emerald) et le protéome total (coloration au Sypro Ruby), voire également de considérer le phosphoprotéome (coloration au ProQ Diamond) (Graham et al., 2008 ; Maronedze et al., 2013 ; Wu et al., 2005). Cependant, bien que le ProQ Emerald soit un colorant compatible avec l'utilisation du ProQ Diamond et du Sypro Ruby, il ne constitue pas un colorant sélectif et exclusif des protéines O-GlcNAcylées.

Au vu de récents développements liant O-GlcNAcylation et Click Chemistry, j'ai entrepris de développer au laboratoire **une stratégie d'analyse protéomique multiplex permettant la détection du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome total au**

sein d'un même gel. Les protéines O-GlcNAcylées sont marquées par un fluorophore (TAMRA or Alexa Fluor 488) ; comme nous l'avons vu précédemment, la réaction de couplage de type azide-alkyne (Click Chemistry) nécessite qu'une fonction azide soit incorporée au niveau des protéines O-GlcNAcylées. Nous avons donc comparé le marquage métabolique par la GlcNAz (Ac₄GlcNAz), et le marquage enzymatique par la β-1,4-galactosyltransférase (GalT^{Y289L}). Nous avons envisagé de détecter le phosphoprotéome par l'intermédiaire du ProQ Diamond, utilisé dans différentes approches d'analyse protéomique différentielle de type bottom-up (Dubois et al., 2011b ; Liu et al., 2007a ; Steinberg et al., 2003). Le protéome global est quant à lui détecté soit par coloration au Sypro Ruby, soit par marquage direct des protéines par un fluorophore de type T-Dye (DyeAgnostics). L'acquisition séquentielle des images va permettre de visualiser les protéines O-GlcNAcylées, les protéines phosphorylées, et enfin l'ensemble des protéines.

4.2.2. Comparaison des différentes approches méthodologiques proposées dans la littérature.

4.2.2.1. Optimisation des conditions de marquage et de détection des protéines O-GlcNAcylées.

Notre idée était de pouvoir coupler les colorations au ProQ Diamond et au Sypro Ruby avec la détection des protéines O-GlcNAcylées, sachant qu'au niveau commercial sont distribués les différents réactifs de couplage pour la biotine (qui ne présentait pas d'intérêt dans notre stratégie), le dapoxy (pour lequel nous ne disposions pas du filtre d'excitation) et le TAMRA. Cependant, le TAMRA et la ProQ Diamond n'étant pas compatibles pour la détection du O-GlcNAcome et du phosphoprotéome, notre choix s'est tourné vers l'Alexa Fluor 488 pour le marquage des protéines O-GlcNAcylées. De plus, lorsque nous avons comparé les signaux obtenus après l'Alexa Fluor 488 et le TAMRA, il s'est avéré que les signaux obtenus avec le TAMRA étaient moins résolus et moins intenses que ceux obtenus avec l'Alexa Fluor 488, ce qui nous a conforté dans le choix de ce fluorophore pour la poursuite des expériences. Il est à noter que la présence de ces fluorophores n'influent ni sur la détection du phosphoprotéome (coloration au ProQ Diamond), ni sur la détection du protéome global (coloration au Sypro Ruby).

Nous avons entrepris de comparer le marquage métabolique (incorporation de l'Ac₄GlcNAz par les cellules et transfert de la GlcNAz *in cellulo*) et le marquage enzymatique *in vitro* (transfert de GalNAz par la galactosyltransférase) sur notre modèle cellulaire, correspondant à des myotubes matures de type C2C12. Nous avons également comparé les deux types d'incorporation de la fonction azide sur l'extrait protéique total, ainsi que sur la fraction cytosolique. L'ensemble des résultats est présenté figure 42 ; pour la fraction cytosolique, seul les résultats du marquage *in vitro* sont présentés. En effet, lors de l'extraction différentielle nous permettant d'accéder à la fraction cytosolique, l'un des tampons utilisé contient du dithiothréitol. Ce composé peut potentiellement réduire la fonction azide, et donc interférer avec les réactions de couplage en aval.

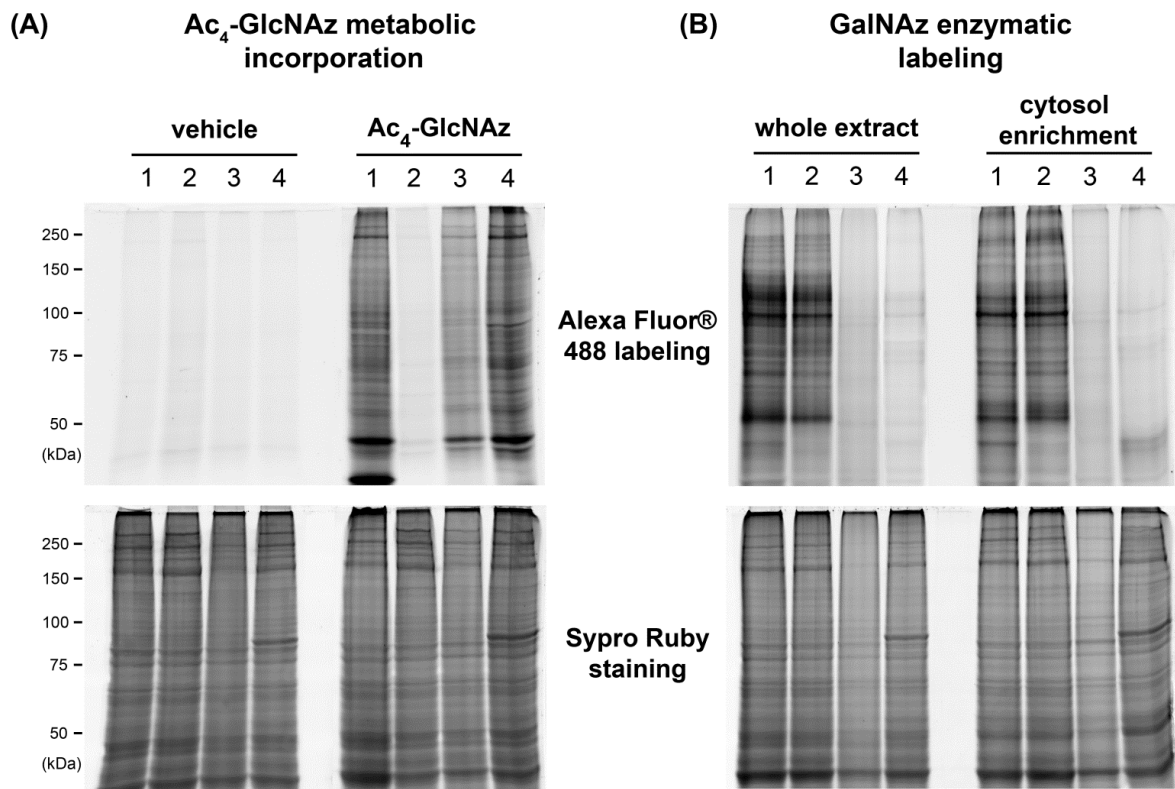


Figure 42 : Comparaison du marquage métabolique par la GlcNAz et du marquage enzymatique par la galactosyltransférase. Les protéines glycosylées de la fraction totale ou cytosolique sont marquées par une fonction azide soit par marquage métabolique (A) soit par marquage enzymatique (B), le couplage étant effectué avec l'Alexa Fluor 488. Les gels sont ensuite colorés au Sypro Ruby. (1) Protéines non déglycosylées préalablement au marquage ; (2) déglycosylation par action de la PNGase F ; (3) déglycosylation par β -élimination ; (4) déglycosylation par action de la β -N-acétyl-hexosaminidase. (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2014a).

Nous avons ainsi observé que lors du marquage métabolique, la quasi-totalité des signaux disparaissaient lorsque les protéines étaient N-déglycosylées avant le couplage à l'Alexa Fluor 488, alors que la β -N-acétyl-hexosaminidase n'avait que peu d'effet sur le profil protéique. Ces données nous indiquent donc que lors du marquage métabolique, les résidus de GlcNAz sont préférentiellement incorporés au niveau des glycoprotéines modifiées par des glycanes complexes (notamment les N-glycanes) plutôt que sur les protéines O-GlcNAcylées. En revanche, dans le cas du marquage enzymatique, les profils sont très proches si l'on compare l'extrait total et la fraction cytosolique. De plus, la N-déglycosylation ne modifie pas le profil protéique, tandis que la O-déglycosylation par β -élimination et par action de la β -N-acétyl-hexosaminidase conduit à la perte totale des signaux. L'ensemble de ces résultats nous a poussés à abandonner le marquage métabolique au profit du marquage enzymatique par la galactosyltransférase.

4.2.2.2. Cartographie du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome global.

Nous avons enfin comparé deux méthodes de détection du profil protéique global, soit par coloration au Sypro Ruby, soit par marquage des protéines avec le fluorophore T-Red 310

(DyeAgnostics). La coloration au Sypro Ruby faisait suite à la détection du O-GlcNAcome puis à la coloration au ProQ Diamond. En revanche, dans le cas du marquage au T-Red 310, l'avantage est de pouvoir détecter le O-GlcNAcome et le protéome global, avant d'effectuer la détection du phosphoprotéome par coloration au ProQ Diamond. Il est à noter que lors du double marquage (Alexa Fluor 488 et T-Red 310), la séquence de marquage est importante, ce qui requiert d'effectuer le marquage au T-Red 310 devant être effectué avant le couplage des protéines O-GlcNAcylées. Les profils de gels 2D obtenus sont présentés figure 43, avec notamment des zones d'intérêt agrandies (figure 43C), permettant de visualiser des protéines O-GlcNAcylées mais non phosphorylées (première colonne), des protéines O-GlcNAcylées et phosphorylées (seconde colonne), et enfin des protéines non glycosylées mais phosphorylées (dernière colonne).

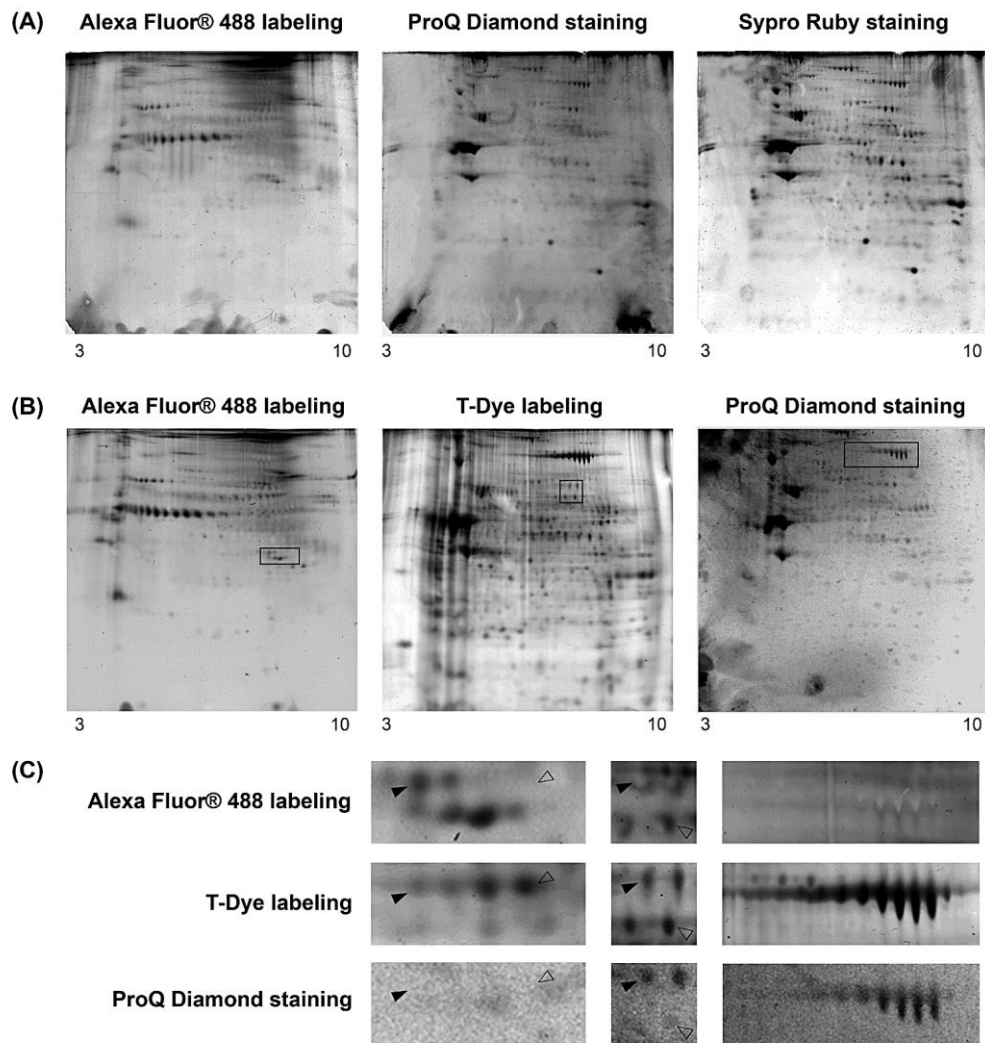


Figure 43 : Cartographies du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome global. Cinq cents microgrammes de protéines cytosoliques ont été marquées enzymatiquement par la GalNAz, permettant un couplage en aval avec l'Alexa Fluor 488. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Le O-GlcNAcome est visualisé grâce à l'Alexa Fluor 488, tandis que le phosphoprotéome est détecté après coloration au Sypro Ruby. Le protéome global est quant à lui détecté soit par coloration au Sypro Ruby (en A), soit par marquage avec le fluorophore T-Red 310 (en B) ; dans ce cas, la détection du phosphoprotéome a lieu après la détection du O-GlcNAcome et du protéome global. Certaines zones d'intérêt sont agrandies en (C), permettant ainsi de discriminer les protéines non modifiées, des protéines O-GlcNAcylées et/ou phosphorylées. (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2014a).

5. Identification des sites de O-GlcNAcylation.

Afin de comprendre la fonction de la O-GlcNAcylation, il est essentiel de localiser précisément les motifs O-GlcNAc au niveau des protéines. C'est la raison pour laquelle, dans le cadre du projet MYOSIGNAL (ANR Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs que je coordonnais), nous avons entrepris l'identification des sites de O-GlcNAcylation des protéines extraites de cellules musculaires en culture (cellules C2C12 différenciées en myotubes). Ce projet a été réalisé avec Barbara DERACINOIS, recrutée au laboratoire en tant que post-doctorante, et financée par ce contrat ANR. Les résultats découlant de ce projet sont actuellement en cours de soumission à Molecular and Cellular Proteomics (Deracinois et al., 2015a).

Pendant de nombreuses années, bien qu'il ait été admis que la O-GlcNAcylation jouait un rôle prépondérant dans différents processus intracellulaires, les progrès dans l'identification des sites O-GlcNAcylés étaient relativement lents, en majeure partie à cause de l'absence d'outils simples, efficaces et sensibles pour l'enrichissement des protéines/peptides glycosylés (Wang & Hart, 2008). Lorsque le projet a été initié, j'avais envisagé d'identifier des sites de O-GlcNAcylation selon différentes approches expérimentales décrites alors dans la bibliographie (Hedou et al., 2009 ; Zeidan et al., 2010). Cependant, une autre méthodologie avait été publiée en 2013 (Hahne et al., 2013), et j'ai entrepris d'appliquer cette nouvelle méthodologie, en y associant différents protocoles de fractionnement cellulaire afin d'augmenter le nombre de protéines et de sites identifiées comme étant O-GlcNAcylés.

5.1. Revue de littérature : problématique de l'identification des sites de O-GlcNAcylation.

Comme pour les autres modifications post-traductionnelles, la localisation des sites de O-GlcNAcylation est un pré-requis indispensable pour la compréhension de sa fonction biologique. La localisation des sites de O-GlcNAcylation reste encore assez difficile aujourd'hui pour plusieurs raisons : (i) la O-GlcNAcylation est généralement présente à une stoechiométrie très faible au niveau des protéines, (ii) la présence en très large excès de peptides non modifiés conduit à la suppression d'ionisation du peptide modifié (et donc diminue sensiblement sa détection, et (iii) la liaison β entre le groupement hydroxyle des sérines et thréonines modifiées est labile, et se rompt lors la fragmentation par collision en spectrométrie de masse en tandem (CID : Collision-Induced Dissociation), conduisant ainsi à la perte d'information concernant le site modifié (Hu et al., 2010). Afin de limiter la perte du monosaccharide en spectrométrie de masse en tandem, l'ionisation des peptides par ECD (Electron Capture Dissociation) ou par ETD (Electron Transfer Dissociation) permet une localisation directe des sites de O-GlcNAcylation puisque la liaison peptide-O-GlcNAc reste stable durant la fragmentation (Hahne & Kuster, 2011 ; Mirgorodskaya et al., 1999 ; Vosseller et al., 2006).

L'enrichissement des peptides modifiés reste une étape clé pour l'identification des sites de O-GlcNAcylation. La méthode d'enrichissement la plus simple est la purification par

immuno-affinité ou par chromatographie d'affinité. Ainsi, des chromatographies de faible affinité (LWAC, Lectin Weak Affinity Chromatography), basée sur l'utilisation de lectines (WGA) en HPLC ont été utilisées avec succès dans certaines approches protéomique pour localiser les sites de O-GlcNAcylation (Chalkley et al., 2009 ; Ma et al., 2013 ; Nagel et al., 2013 ; Vosseller et al., 2006). Les peptides modifiés sont retardés par la chromatographie de type LWAC, et collectés en différentes fractions. Les peptides de chaque fraction sont ensuite séparés puis identifiés en LC-MS/MS, notamment en mode ECD ou ETD ; ainsi, près de 150 sites de O-GlcNAcylation ont pu être assignés au niveau de synaptosomes post-synaptiques murins (Chalkley et al., 2009 ; Vosseller et al., 2006), et récemment, jusqu'à 1750 sites de O-GlcNAcylation ont été identifiés à partir de 30 mg de synaptosomes (Trinidad et al., 2012). Bien que peu utilisée pour l'identification des sites de O-GlcNAcylation, l'immuno-affinité peut également être envisagée comme stratégie d'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées préalablement à l'identification des sites de O-GlcNAcylation en spectrométrie de masse (Zhao et al., 2011). Cette approche est en revanche bien adaptée pour identifier le(s) site(s) de O-GlcNAcylation sur une protéine d'intérêt, par une approche ciblée. La protéine d'intérêt est immunoprécipitée, et les peptides tryptiques sont analysés en spectrométrie de masse en mode HCD (High-energy Collisional Dissociation), permettant d'améliorer la fragmentation (Fardini et al., 2015).

Pour contrecarrer la perte du monosaccharide lors de la spectrométrie de masse en tandem, la BEMAD (β -Elimination followed by Michael Addition of DTT) a été appliquée afin de remplacer le résidu de GlcNAc par le dithiothréitol (DTT), et donc de remplacer la liaison labile peptide-GlcNAc par une liaison stable peptide-DTT (Vosseller et al., 2005 ; Wells et al., 2002b). En effet, la β -élimination conduit à l'élimination des résidus de GlcNAc, résultant en un groupement carbonyle α,β -insaturé, pouvant être le site d'ajout d'un nucléophile fort, généralement le DTT. De plus, l'addition du DTT permet également la purification en aval des peptides modifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de thiol. L'identification des sites de O-GlcNAcylation par la BEMAD a ainsi conduit à l'identification d'une vingtaine de protéines extraites du cerveau de rat (Vosseller et al., 2005 ; Wells et al., 2002b). Cette approche avait été appliquée il y a quelques années au laboratoire, et avait notamment permis la localisation de 5 sites de O-GlcNAcylation sur l'actine et la myosine (Hedou et al., 2009), protéines majoritaires du muscle squelettique. La BEMAD peut aussi être considérée en vue de la quantification de la O-GlcNAcylation par l'utilisation d'un isotope stable du DTT (Vosseller et al., 2005). Cependant, l'inconvénient majeur de la BEMAD est qu'elle conduit à une identification indirecte des sites de O-GlcNAcylation, et qu'elle nécessite de multiples contrôles de spécificité afin d'éliminer les faux positifs ; en effet, les groupements phosphoryles (notamment sur les résidus de sérine et de thréonine) sont également sensibles à la β -élimination, qui peut aussi affecter des résidus de sérine et de thréonine non modifiés, ainsi que des cystéines alkylées. Un autre point important est que la BEMAD peut conduire à une dégradation du squelette peptidique (Hahne et al., 2013), et donc à la perte de données de séquence.

D'autres alternatives ont depuis émergé, me semblant plus spécifiques et sensibles comparativement à celle décrite ci-dessus. Ces alternatives font appel au marquage chimioenzymatique par la galactosyltransférase (GalT^{Y289L}). Comme nous l'avons vu

précédemment, cette stratégie va conduire au transfert d'un analogue du galactose, modifié par une fonction azide, sur le groupement hydroxyl en C4 d'un accepteur GlcNAc (Khidekel et al., 2003). Ce groupement azide constitue un site accepteur pour l'aminooxy-biotine, permettant en aval la purification des protéines/peptides O-GlcNAcylés sur billes de streptavidine (Dehennaut et al., 2008 ; Khidekel et al., 2003 ; Khidekel et al., 2007 ; Tai et al., 2004) (figure 44). La haute affinité de la streptavidine pour la biotine liée aux protéines/peptides-O-LacNAc permet un haut degré d'enrichissement, tout en minimisant les interactions aspécifiques grâce à des lavages astringents. Cette stratégie a permis de localiser les sites de O-GlcNAcylation de l'OGT (Tai et al., 2004). Une vingtaine de protéines O-GlcNAcylées de l'ovocyte de Xénope, et un site de O-GlcNAcylation sur la β -actine (Dehennaut et al., 2008) ont également été identifiés par cette approche.

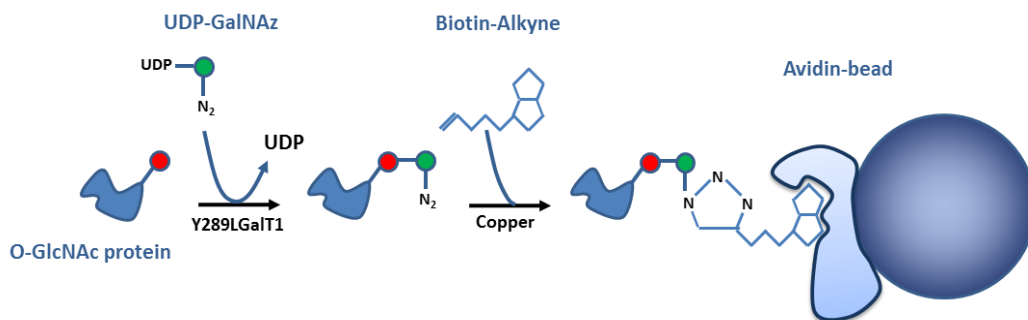


Figure 44 : Marquage des protéines O-GlcNAcylées par la GalNAz et l'alkyne-biotine. Le marquage des protéines O-GlcNAcylées est réalisé par l'intermédiaire de la GalT^{Y289L}, transférant un résidu de GalNAz sur les résidus de GlcNAc. La fonction azide va servir de site accepteur pour le transfert d'alkyne-biotine ; la purification des protéines/peptides O-GlcNAcylés pourra être réalisée en aval par l'intermédiaire de billes d'avidine (d'après Dehennaut et al., 2008).

Cependant, la biotine se fragmente de manière importante durant la MS/MS, rendant les spectres difficiles à analyser, tandis que le lien entre la GlcNAc (plus spécifiquement le lien LacNAz-biotine) et le peptide reste labile (Hu et al., 2010). De plus, les conditions drastiques d'éluion nécessaires pour décrocher la biotine de la streptavidine peuvent conduire à des modifications de certains peptides modifiés, et diminuer le taux de récupération des peptides (Kim, 2011). Pour contrecarrer le problème inhérent à l'interaction biotine-streptavidine, certains protocoles ont été basés sur l'utilisation de biotine clivable par UV, permettant non seulement de libérer les peptides des billes, mais également de charger positivement le peptide (grâce à l'extrémité aminométhyltriazol-acétylgalactosamine générée après le clivage UV), ce qui favorise la fragmentation ETD, et améliore considérablement la localisation des sites de O-GlcNAcylation (Alfaro et al., 2012 ; Wang et al., 2010a ; Wang et al., 2010b). Ainsi, 141 sites de O-GlcNAcylation ont été identifiés au niveau des protéines du fuseau mitotique et du « pont cytoplasmique » ou midbody (Wang et al., 2010b), et 458 sites de O-GlcNAcylation portés par 195 protéines corticales (Wang et al., 2010a). D'autres équipes ont aussi appliqué la stratégie d'enrichissement sur billes de streptavidine, puis dérivé les peptides modifiés par la BEMAD (Khidekel et al., 2004) ; ce couplage des deux stratégies a par la suite permis la localisation de sites de O-GlcNAcylation au niveau de protéines ribosomales (Zeidan et al., 2010), des histones H2A, H2B et H4 (Sakabe et al., 2010), de protéines cardiaques (Ramirez-Correa et al., 2008) ou encore de protéines

érythrocytaires (Wang et al., 2009).

Une alternative à cette méthodologie a été proposée (Hahne et al., 2013), et c'est cette approche que j'ai choisi d'appliquer pour l'identification des sites de O-GlcNAcylation dans les cellules musculaires squelettiques, et qui sera détaillée dans le paragraphe suivant. Pour augmenter le nombre de protéines et de sites de O-GlcNAcylation identifiés, nous avons également entrepris un fractionnement protéique intensif en amont des étapes de marquage/couplage.

5.2. Stratégie expérimentale.

5.2.1. Stratégie choisie, et résultats préliminaires.

Dans son approche méthodologique, Hannes Hahne avait choisi de marquer les protéines O-GlcNAcylées par la GlcNAz (marquage métabolique) (Hahne et al., 2013). Cependant, de par certains résultats obtenus au laboratoire (comme discuté au paragraphe 4.2.2.2.), j'ai préféré opter pour le marquage enzymatique des protéines O-GlcNAcylées par la Y289L-galactosyltransférase, permettant le transfert de GalNAz sur les protéines O-GlcNAcylées (figure 45). Par l'intermédiaire d'un couplage azide/alkyne, les protéines sont couplées de manière covalente à des billes d'agarose, permettant des lavages astringents pour éliminer les protéines non modifiées. Une succession de lavages a ainsi été effectuée sur les billes d'agarose : un lavage d'acide diéthylène triamine penta-acétique (afin d'éliminer le cuivre utilisé comme catalyseur pour le couplage), une succession de lavages en tampon SDS, puis en tampon urée, et enfin, plusieurs lavages à l'acétonitrile. Les protéines liées aux billes d'agarose ont été liées, alkylées, puis digérées par des endoprotéases (mélange trypsine/Glu-C). Les peptides non retenus (donc non glycosylés) ont été dessalés puis analysés en spectro-

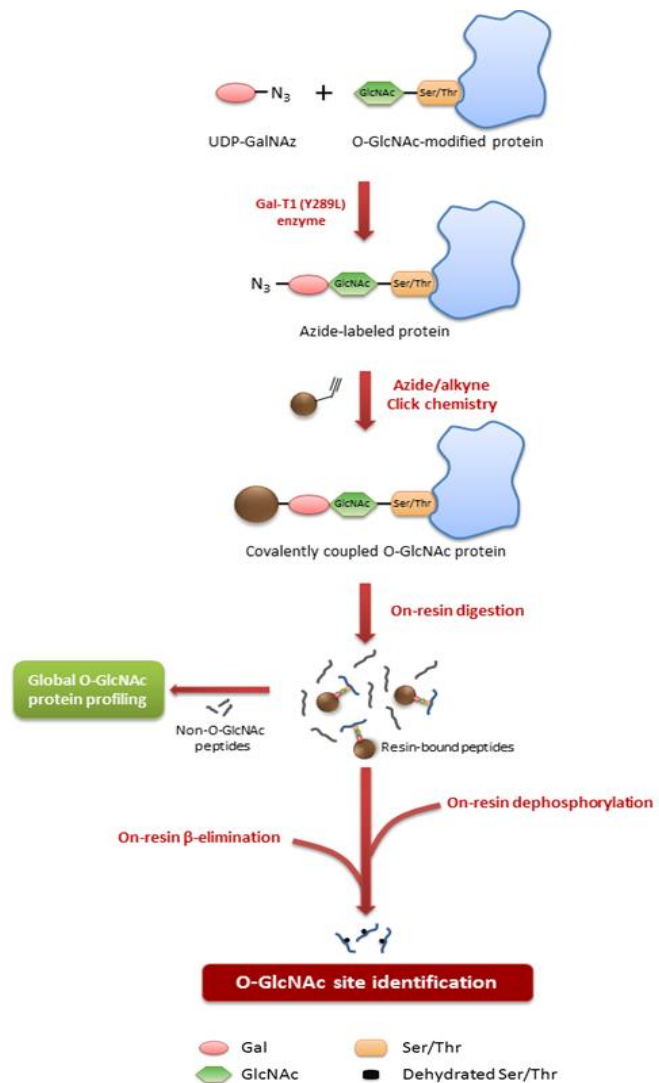


Figure 45 : Stratégie expérimentale choisie pour l'identification des sites de O-GlcNAcylation à partir d'extrait de cellules musculaires de type C2C12 différenciées en myotubes. (d'après Hahne et al., 2013).

métrie de masse. Bien que ces peptides n'apportent aucune donnée en termes de localisation des sites de O-GlcNAcylation, ils permettent en revanche d'identifier les protéines O-GlcNAcylées. Les peptides liés aux billes (correspondant donc aux peptides-O-LacNAc, et donc aux peptides O-GlcNAcylés) ont été traités par un mélange de phosphatases (λ phosphatase et phosphatase alcaline), puis soumis à la β -élimination (Glycoprofile β -elimination kit, Sigma). Les conditions de déphosphorylation et de déglycosylation ont bien entendu été optimisées. Les peptides « β -éliminés » ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse (LTQ-Orbitrap et Orbitrap Velos, en collaboration avec le Dr Luc CAMOIN, Marseille Proteomics), avec une fragmentation par CID (Collision-Induced Fragmentation), en accord avec le protocole de Hahne. Les données ont été analysées sur le serveur Mascot (Matrix Science). Pour les peptides β -éliminés, une modification additionnelle est considérée, à savoir la déshydratation des sérines et des thréonines portant initialement le résidu GlcNAc.

Nous avons tout d'abord testé l'efficacité de la méthode en l'appliquant sur l' α -cristalline bovine, couramment utilisée comme protéine O-GlcNAcylée standard. L'analyse des peptides non modifiés (non retenus) a identifié l' α A-cristalline (13 peptides séquencés, 70.5% de recouvrement) et l' α B-cristalline (8 peptides séquencés, 54.3% de recouvrement). L'analyse des peptides issus de la β -élimination a permis l'identification à un haut degré de confiance de la Ser¹⁶² et la Thr¹⁷⁰ pour l' α A-cristalline et l' α B-cristalline, respectivement, ce qui est en accord avec la bibliographie (Viner et al., 2009).

Nous avons alors entrepris de déterminer les sites de O-GlcNAcylation à partir d'un extrait protéique total (4 mg de protéines) de myotubes C2C12. Afin de tester la spécificité et la sélectivité, le même protocole a été appliqué en parallèle, en absence de la GalT^{Y289L}. L'analyse des peptides non retenus a conduit à l'identification de 7288 peptides, appartenant à 442 protéines, tandis que 427 peptides β -éliminés ont été séquencés, appartenant à 46 protéines différentes. Toutes ces protéines identifiées ont été classées selon leur fonction cellulaire, définie selon le Gene Ontology (GO) ; cette classification est réalisée grâce au système PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationship, <http://www.pantherdb.org>), et les données sont présentées figure 46A. Ainsi, cette première approche a permis l'identification de protéines O-GlcNAcylées impliquées dans des classes variées de fonctions biologiques, telles que des protéines de liaison (protein binding, GO:0005488, \approx 39%), des enzymes (GO:0003824, \approx 21%) et des modulateurs enzymatiques (GO:0030234, \approx 7%), des protéines impliquées dans la transcription (GO:0030528, \approx 13%), des protéines structurales (GO:0005198, \approx 11%), des protéines participant à l'activité de récepteurs membranaires (GO:0004872, \approx 5%) et des protéines de transport (GO:0005215, 3%). Parmi elles, plusieurs d'entre elles sont impliquées dans diverses voies de signalisation intracellulaires, et une autre classification, toujours selon le système PANTHER, a été effectuée afin de discriminer les différentes voies de transduction concernées ; les données sont présentées figure 46B. Comme nous pouvons l'observer, **nous avons identifié des protéines des voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance, des MAP kinases, ou encore des voies Wnt, Toll ou des interleukines parmi d'autres.**

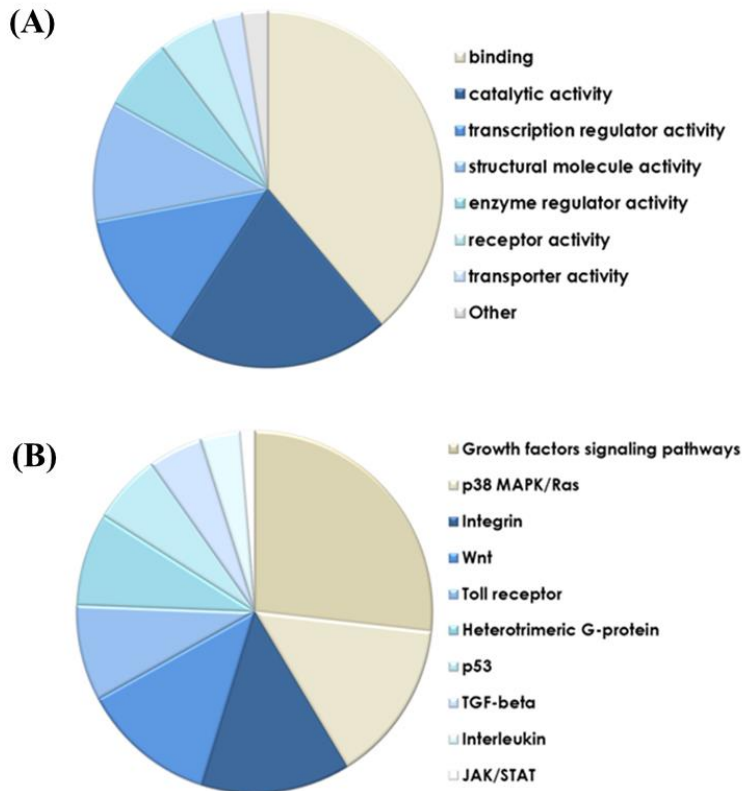


Figure 46 : Identification des protéines O-GlcNAcylées : données préliminaires. (A) Diagramme des fonctions cellulaires des protéines identifiées dans notre première approche. (B) Diagramme des voies de signalisation dans lesquelles sont impliquées les protéines que nous avons identifiées. La classification a été effectuée selon le système PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationship). (<http://www.pantherdb.org>).

5.2.2. Fractionnement de l'extrait protéique.

La stratégie de fractionnement que nous avons entreprise d'appliquer est représentée figure 47. En tout premier lieu, nous avons appliqué un protocole d'extraction différentielle, permettant l'obtention de fractions enrichies en cytosol, en membranes ou en myofilaments (Yin et al., 2010). Nous nous sommes ensuite focalisés sur la fraction cytosolique, dans le but d'éliminer les protéines les plus abondantes dans les cellules musculaires, constitutives de l'appareil contractile présent dans les myotubes. Nous avons ensuite réalisé un fractionnement en fonction de la solubilité des protéines à différentes concentrations de sels, plus particulièrement le sulfate d'ammonium (solution saturée à 25, 50, 75 et 100% de sulfate d'ammonium (SA)). Après dessalage, les protéines constitutives des fractions SA25, SA50, SA75 ont été

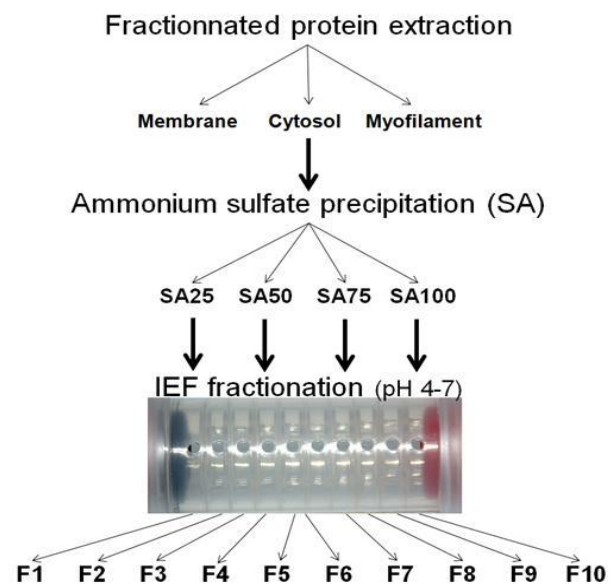


Figure 47 : Stratégie de fractionnement du protéome de myotubes C2C12. Trois étapes de fractionnement ont été envisagées : (i) extraction différentielle, (ii) précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, et (iii) séparation selon le point isoélectrique.

séparées selon leur point isoélectrique grâce au MicroRotofor (Biorad). L'ensemble du processus a été mis en place au laboratoire dans le cadre de ce projet. La séparation a été effectuée sur une gamme de pH de 4 à 7. La fraction SA100 a été retirée de l'analyse, car les protéines présentes dans cette fraction étaient extrêmement difficile à solubiliser, et, de plus, ne contenait que 0.8% des protéines présentes dans l'extrait protéique initial. Après séparation avec le MicroRotofor, sur une gamme de pH de 4 à 7, dix sous-fractions ont ainsi été obtenues pour chaque fraction résultant de la précipitation saline. Les profils protéiques obtenus pour les différentes fractions issues de chacune des étapes de fractionnement sont représentés figure 48, ainsi que le pourcentage de protéines retrouvées dans chaque fraction, comparativement à l'extrait de départ, non fractionné, regroupant 100% des protéines.

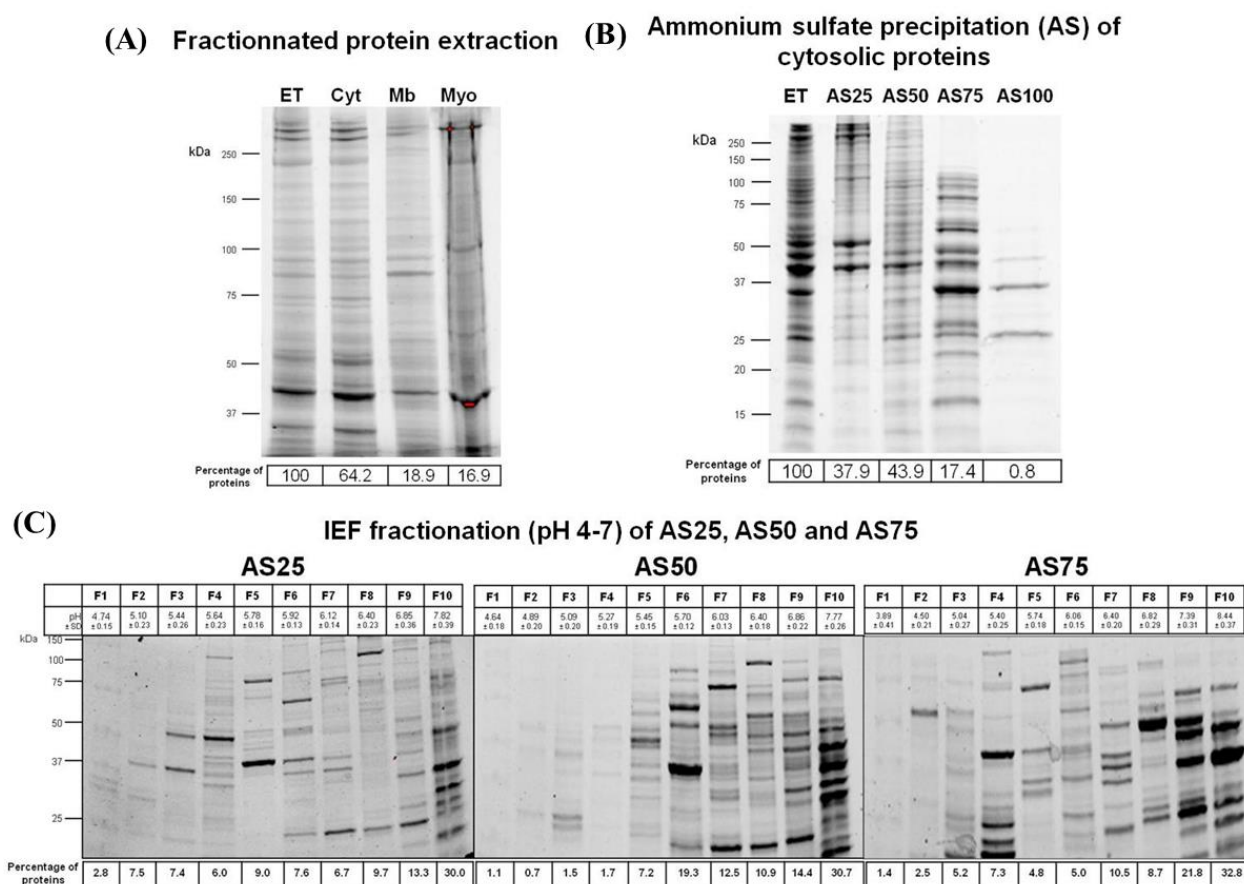


Figure 48 : Profils protéiques de chaque fraction issue des différents protocoles de fractionnement. (A) Extraction différentielle des protéines : trois fractions enrichies en cytosol (Cyt), membranes (Mb) et myofilaments (Myo) sont obtenues par rapport à l'extrait total (ET). (B) Précipitation au sulfate d'ammonium (AS) de la fraction cytosolique, AS25, 50, 75 et 100 correspondant aux pourcentages de sulfate d'ammonium. (C) Fractionnement selon le point isoélectrique par MicroRotofor pour les fractions AS25, AS50 et AS75. Sous chaque fraction est indiqué le pourcentage de protéines par rapport à l'extrait initial utilisé pour le fractionnement.

Sur chaque fraction obtenue a été appliqué le protocole de Click Chemistry décrit dans le paragraphe précédent, permettant ainsi l'identification d'un grand nombre de protéines O-GlcNAcylées, et la localisation de sites modifiés par le résidu de GlcNAc.

5.3. Identification des protéines O-GlcNAcylées après fractionnement : bilan.

5.3.1. 1644 protéines identifiées, 898 peptides-O-GlcNAc

A partir de l'échantillon non fractionné, nous avons identifié 554 protéines O-GlcNAcylées, identifiées grâce au séquençage de 5340 peptides ; 373 peptides O-GlcNAcylés ont été identifiés à partir des peptides libérés des billes d'agarose par la β -élimination, contenant au moins un site de O-GlcNAcylation pour chacun d'entre eux. A partir de l'extrait cytosolique, 449 protéines O-GlcNAcylées ont été identifiées (à partir de 5540 peptides), et 226 peptides O-GlcNAcylés. Le fractionnement de l'extrait cytosolique (après précipitation différentielle au sulfate d'ammonium et selon le point isoélectrique) a permis d'identifier 1362 protéines O-GlcNAcylées à partir de 14573 peptides séquencés et 898 peptides O-GlcNAcylés, ce qui renforce la nécessité de fractionner l'extrait protéique pour augmenter le nombre de protéines identifiées. Toutes ces données ont indiquées dans le tableau récapitulatif ci-dessous (tableau V). Il est à noter que certaines protéines identifiées dans l'extrait total, sans fractionnement, n'étaient pas identifiées lors de notre analyse avec fractionnement ; le nombre de protéines identifiées s'élève donc à 1644 protéines O-GlcNAcylées.

Tableau V : Identification des protéines O-GlcNAcylées et des sites de O-GlcNAcylation. Sont indiqués le nombre de peptides identifiés dans les différentes fractions : extrait total, extrait cytosolique, et extrait cytosolique fractionné SA25 SA50 et SA75, résultant de la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium (dans ce cas, les résultats issus de l'analyse des fractions obtenus après le MicroRotor ont été poolées).

	Extrait total	Extrait cyto-solique	CYT AS25	CYT AS50	CYT AS75	CYT AS25-AS50-AS75
Nombre de protéines identifiées	554	449	796	848	459	1362
Nombre de peptides identifiés	5340	5540	9042	7155	3449	14573
Nombre de peptides O-GlcNAcylés	373	226	658	330	69	898

Ces données sont actuellement en cours de soumission (Deracinois et al., 2015a) ; de plus, l'ensemble des données protéomiques issues de ce projet sont en cours de dépôt dans la banque de données PRIDE (PRIDE, <http://www.ebi.ac.uk/pride>). Cette banque de données permet de déposer des données protéomiques, accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique, et permet de déposer, pour une expérience donnée, la liste de protéines identifiées, leur numéro d'accèsion, les peptides (et leur séquence) ayant permis d'identifier les protéines, les modifications post-traductionnelles des peptides, une description des analyses effectuées... (Jones et al., 2006 ; Martens et al., 2005 ; Reisinger et al., 2015). Depuis l'initiation du projet PRIDE il y a 10 ans, il y a eu un énorme essor du dépôt des données protéomiques, passant d'environ 9 900 expériences de protéomique déposées dans la

banque de données en septembre 2009, à près de 26 000 en septembre 2012 (Vizcaino et al., 2013), et 53 000 aujourd'hui (<http://www.ebi.ac.uk/pride>).

5.3.2. Quelques exemples...

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, nous avons identifié près de 900 peptides O-GlcNAcylés, certains peptides présentant plusieurs résidus de sérine ou de thréonine modifiés. J'ai choisi de ne présenter que quelques protéines (dont les sites ont été localisés pour certaines d'entre elles) pouvant présenter un intérêt dans nos projets de recherche (tableau VI).

Tableau VI : Identification de protéines O-GlcNAcylées et localisation des sites modifiés sur certaines d'entre elles. Sont indiqués dans ce tableau la protéine, son numéro d'accèsion, sa principale fonction cellulaires ainsi que les sites modifiés. (NI : non identifié).

Protéine	Numéro d'accèsion (UniProKB)	Fonction cellulaire principale	Sites de O-GlcNAcylation identifiés
PROTEINES STRUCTURALES			
Syncoiline	Q9EPM5	Protéine des filaments intermédiaires permettant le couplage du stress mécanique entre la myofibrille et l'extérieur de la fibre. Facilite la transmission de la force.	NI
Titine	E9Q8K5	Protéine clé de l'organisation sarcomérique, à l'origine des propriétés d'élasticité du muscle. Fixe de nombreux éléments de signalisation.	S24949 ; T24950 ; S24954 ; T24957
BAG3 family chaperone regulator 3	Q9JLV1	Inhibe l'activité de chaperon d'HSP70/HSC70. Possède aussi une activité anti-apoptotique.	S189 ; S373
Desmine	P31001	Protéine des filaments de type III, formant un réseau fibreux connectant les myofibrilles entre elles au sarcolemme.	S460
Myopalladine	Q5DTJ9	Composant des stries Z reliant la nébuline à l' α -actinine.	S383 ; S384 ; T387 ; T388 ; S389
Myosin-binding protein H	P70402	Liée à la myosine au niveau de la bande A.	S7
PROTEINES DES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES			
TGF-β-activated kinase 1-binding protein 3 (MAPKKK7-interacting protein)	Q571K4	Protéines médiatrices de l'activation de MAP3K7, impliquées dans les voies de signalisation de l'IL-1 et du TNF. Joue un rôle dans l'activation du NF κ B.	S413
cAMP-dependant protein kinase inhibitor alpha	P63248	Inhibiteur compétitif de l'activité de la PKA.	S76

(PKI alpha)			
Serine/threonine protein kinase WNK1	P83741	Rôle important dans la signalisation cellulaire, la survie et la prolifération. Rôle dans la réorganisation du cytosquelette.	S1230 ; T1841 ; S1845 ; S2301 ; T2307
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (MYPT1)	Q9DBR7	Régulateur de la protéine phosphatase 1C. Localisée le long des filaments d'actomyosine et des fibres de stress.	S381 ; S386 ; S564 ; S566 ; T570
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14C	Q8R4S0	Régulateur de la protéine phosphatase 1CA.	S36
LIM domain-binding protein 3	Q9JKS4	Fonction d'adaptateur dans le muscle strié pour coupler la signalisation médiée par la PKC au cytosquelette.	S90 ; S381
Target of rapamycin complex subunit LST8	Q9DCJ1	Sous-unité des complexes mTORC1 et mTORC2, régulant la croissance cellulaire et la survie en réponse aux nutriments et aux signaux hormonaux. LST8 augmente l'activité de mTOR.	NI
Ataxine 2	O70305	Impliqué dans le recyclage du récepteur à l'EGF ; agit comme un régulateur négatif de l'EGFR.	S779
TRANSCRIPTION/TRADUCTION			
60S acidic ribosomal protein P2	P99027	Rôle important dans la synthèse protéique.	S74
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	P70670	Facteur de transcription spécifique du muscle, régulant l'expression des gènes impliqués dans le développement. Impliqué dans l'assemblage des filaments fins et des filaments épais des myofibrilles.	S29 ; S129 ; S159 ; S180 ; T181 ; T189 ; T227 ; S392 ; S403 ; T408 ; S522 ; T558 ; T559 ; T580 ; S615 ; S708 ; T760 ; T835 ; T972 ; S1243 ; T1485 ; S1541 ; S1613 ; S1695 ; T1728 ; S1749 ; S1764

6. Discussion générale et perspectives.

Depuis mon doctorat, la protéomique a toujours été associée à mes projets de recherche. Mes premiers pas dans le domaine de la protéomique, au cours de ma thèse, m'avait conduite au cours de ma thèse à l'identification de diverses catégories de protéines musculaires, modifiées par cette glycosylation si particulière, notamment des protéines contractiles, et des protéines structurales, ce qui a été à la base de certains projets passés, actuels et futurs. Depuis mon recrutement en tant que Maître de Conférences, j'ai mis en place au laboratoire différentes méthodologies de protéomique, telles que la stratégie multiplex pour

l'analyse de la variation de O-GlcNAcylation, et/ou de phosphorylation, et/ou d'expression des protéines, étape essentielle pour la poursuite d'un projet de recherche qui sera développé dans ce mémoire, concernant notamment la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation dans la structuration sarcomérique.

De plus, l'identification des sites de O-GlcNAcylation nous ouvre également de nouveaux horizons de recherche portant sur la compréhension de différents processus cellulaires régulés par la O-GlcNAcylation. En particulier, l'identification de différentes protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaires, comme la protéine LST8, des sous-unités de protéines phosphatases ou certaines protéines impliquées dans la traduction telles que des protéines ribosomales, nous permettront de mieux comprendre certaines données quant à la régulation de l'homéostasie protéique (les travaux se rapportant à l'homéostasie protéique seront présentés dans le chapitre III). De manière intéressante, les sites de O-GlcNAcylation au niveau de la titine sont localisés à proximité du domaine de fixation de MuRF1.

Nous avons également identifié de nombreuses protéines structurales modifiées par la O-GlcNAcylation, ce qui nous ouvrent également de nouvelles perspectives quant à l'analyse du rôle de cette glycosylation dans la structuration du sarcomère (ou des interactions protéine-protéine). Ainsi, pour ne citer qu'une protéine, nous avons localisé un site de O-GlcNAcylation au niveau de la desmine, correspondant à un site muté dans les desminopathies. Je détaillerai dans la partie « Projet de recherche » les travaux envisagés pour caractériser le rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation de la fonction de la desmine, et sa possible implication dans certaines formes de desminopathies. Dans le cadre de ce projet, je souhaite également mettre en place au laboratoire la stratégie de SILAC (voire de SILAM), notamment (i) pour mieux comprendre le rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation de l'interactome de la desmine, et (ii) pour mettre en place une stratégie de quantification site à site. Je développerai plus particulièrement ces projets dans la partie « Projet de recherche » de ce mémoire.

CHAPITRE II

*O-GlcNAcylation,
modulation de la contraction
musculaire & MLC2*

CHAPITRE II

O-GlcNAcylation, modulation de la contraction musculaire & MLC2

1. Problématique.

Comme nous l'avons vu dans la revue générale de littérature, l'activité contractile est la fonction principale du muscle squelettique. Cette activité contractile est fortement régulée par l'ion calcium qui va moduler les interactions entre myosine et actine et déclencher l'activité mécanique du muscle squelettique. Au cours de différents travaux, nous avons mis en évidence au laboratoire qu'un grand nombre de protéines motrices et régulatrices de la contraction étaient modifiées par la O-GlcNAcylation (tableau VII).

Tableau VII : Protéines motrices et régulatrices de la contraction du muscle squelettique modifiées par la O-GlcNAcylation. Sont indiquées dans ce tableau les différentes isoformes modifiées par la O-GlcNAcylation.

	Protéines	Isoformes décrites comme O-GlcNAcylées
Filaments épais	MHC (Myosin Heavy Chain)	MHCI (slow), MHCIIA, MHCIIIB, MHCIIIX
	MLC1 (Myosin Light Chain 1)	MLC1s, MLC1f
	MLC2 (regulatory Myosin Light Chain)	MLC2s, MLC2f
Filament fin	Actine	/
	Tropomyosin	Tm β
	Troponine C	?
	Troponine T	sTnT1, sTnT2, fTnT1, fTnT2, fTnT3 fTnT4
	Troponine I	sTnI, fTnI

Nous avons donc entrepris de déterminer si la O-GlcNAcylation pouvait jouer un rôle dans l'activité contractile du muscle squelettique en mesurant la relation tension/pCa au niveau de fibres musculaires. Ces travaux ont été initiés durant ma thèse puis poursuivis lors de mon recrutement au laboratoire. L'ensemble de ces travaux ont conduit à une publication lors de ma thèse en tant que co-auteure avec Julie HEDOU, une autre étudiante en thèse sous

la direction du Pr Bruno BASTIDE (Hedou et al., 2007), puis à deux publications (Cieniewski-Bernard et al., 2012 ; Cieniewski-Bernard et al., 2014b) et deux revues (Cieniewski-Bernard et al., 2009 ; Cieniewski-Bernard et al., 2014c) en tant que Maître de Conférences. J'ai également été associée à deux autres publications du laboratoire (Bozzo et al., 2005 ; Stevens et al., 2013). L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire concerne la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation des propriétés d'activation calcique, ainsi que l'étude focalisée sur la MLC2, protéine régulatrice de la contraction musculaire.

2. O-GlcNAcylation et propriétés d'activation calciques

2.1. Mesure des propriétés d'activation calcique et relation tension/pCa.

L'étude des caractéristiques d'activation calcique des fibres musculaires est une méthode qui permet d'avoir accès au fonctionnement de la machinerie myofibrillaire et d'analyser les propriétés contractiles des fibres musculaires. Les caractéristiques d'activation calcique des fibres pelées (le pelage permettant de perméabiliser le sarcolemme, et donc d'avoir un accès direct aux protéines contractiles) sont classiquement étudiées *via* la tension développée par une fibre en fonction de la concentration calcique (relation Tension/pCa avec $pCa = -\log [Ca^{2+}]$) (figure 49).

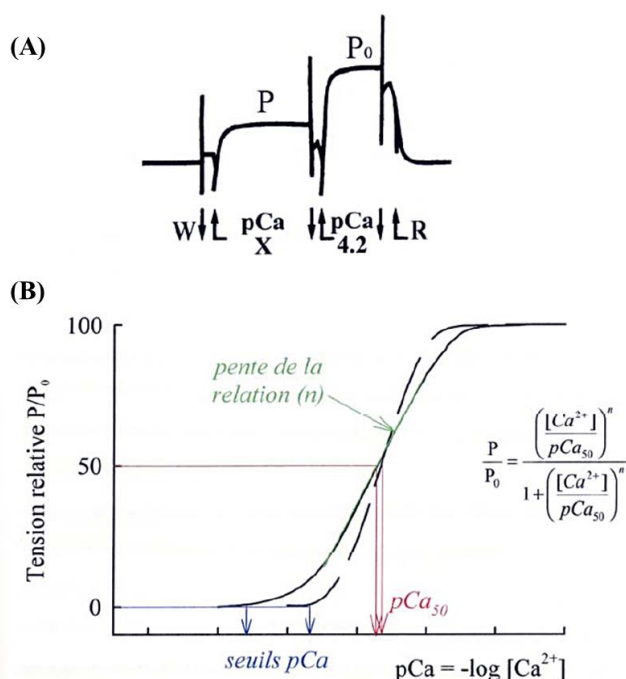


Figure 49 : Détermination des caractéristiques d'activation calcique avec la relation Tension/pCa. (A) Tracé d'enregistrement de tensions isométriques P développées par une fibre. L'application d'une solution de concentration $pCaX$ est suivie par l'application d'une solution saturante en calcium ($pCa_{4.2}$) permettant de déterminer la tension maximale P_0 développée par la fibre. L'ajout (flèches pointées vers le haut) ou le retrait des solutions W (solution de lavage) ou R (solution relaxante) sont indiqués. (B) Relation tension/pCa d'une fibre lente (trait plein) et rapide (trait discontinu). La pente de la relation (vert) est ajustée à l'aide de l'équation de Hill (insert) (d'après Kischel, 2000).

Il est ainsi possible d'identifier le rôle modulateur des différentes protéines de la machinerie contractile, les spécificités liées à l'isoforme exprimée et les conséquences d'une modification d'expression sur la contraction par l'étude des paramètres caractérisant la relation tension/pCa, qui traduit les propriétés d'activation calcique d'une fibre musculaire. Ces relations T/pCa ont une allure sigmoïde ; trois paramètres, correspondant à différentes caractéristiques d'activation calcique, peuvent ainsi être déterminés à partir de la courbe :

- le seuil d'activation, c'est-à-dire la concentration minimale en calcium nécessaire pour induire une tension ; le seuil d'activation est indicateur de la sensibilité calcique du système contractile qui est dépendant principalement de la TnC ;
- la valeur de la pCa_{50} , c'est-à-dire la concentration nécessaire en calcium pour induire 50 % de la tension maximale P_0 ; c'est un indicateur de l'affinité calcique, dépendant de la TnC ;
- la pente de la sigmoïde, donnée par l'équation de Hill, traduit le degré de coopérativité entre les sites régulateurs de la TnC et les protéines régulatrices du filament fin, impliquant plus particulièrement la TnT et la Tm.

Les relations tension/ pCa sont caractéristiques et spécifiques des isoformes lente ou rapide des protéines contractiles motrices et régulatrices exprimées par la fibre musculaire. Les fibres lentes ont un seuil d'activation inférieur aux fibres rapides, traduisant une meilleure sensibilité calcique du système contractile. Les fibres rapides présentent une coopérativité supérieure (car le coefficient de Hill est plus élevé). Par ailleurs, selon l'état de phosphorylation de certaines protéines, telles que la MLC2, la sensibilité calcique de la fibre peut augmenter ou diminuer, ce qui va se traduire par un déplacement de la relation tension/ pCa . Des différences de sensibilité et d'affinité calcique seront directement impliquées dans l'intensité de la force produite par la fibre musculaire.

2.2. Effet de la N-acétyl-D-glucosamine libre sur les propriétés d'activation calciques de fibres de soléaire.

Afin de caractériser le rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation des propriétés d'activation calcique, nous avons, dans une première approche, incubé des fibres musculaires pelées (fibres lentes isolées du soléaire) dans une solution de N-acétyl-D-glucosamine en excès, afin de lever d'éventuelles interactions protéine-protéine mettant en jeu la O-GlcNAc. Toutes les solutions nécessaires pour l'établissement de la courbe T/ pCa sont additionnées de GlcNAc, GalNAc ou de glycérol selon les conditions expérimentales, à une concentration de 0.2 M. L'ensemble des résultats sont présentés figure 50.

Nous avons démontré qu'une solution de glycérol ne modifiait pas les propriétés d'activation calcique de la fibre squelettique figure 50A, de même qu'une solution de GalNAc, épimère en C4 de la GlcNAc (figure 50C). En revanche, lorsque la relation tension/ pCa est établie en présence de N-acétyl-D-glucosamine libre, il y a un déplacement significatif de la courbe vers la droite (figure 50B), c'est-à-dire une **augmentation du seuil d'activation calcique et de la pCa_{50} , traduisant une diminution de la sensibilité et de l'affinité calciques des fibres musculaires**. En revanche, les valeurs des coefficients de Hill n_1 et n_2 ne sont pas modifiées ; la coopérativité au sein du filament fin n'est donc pas modifiée par l'incubation de la fibre dans une solution de N-acétyl-D-glucosamine. Toutes les données numériques sont présentées dans le document annexe (Hedou et al., 2007). Nos données indiquent également que la tension maximale P_0 , développée à la concentration maximale de Ca^{2+} ($pCa_{4.2}$), n'est pas modifiée lorsque les fibres sont incubées en présence de GlcNAc. Enfin, les effets induits par la GlcNAc sur le seuil d'activation calcique et la pCa_{50} sont

réversibles, puisque la relation T/pCa devient similaire à la courbe contrôle lorsque la GlcNAc est éliminée du milieu environnant des fibres musculaires (figure 50D). Des résultats similaires ont été obtenus à partir de fibres musculaires isolées d'une biopsie humaine (Cieniewski-Bernard et al., 2009).

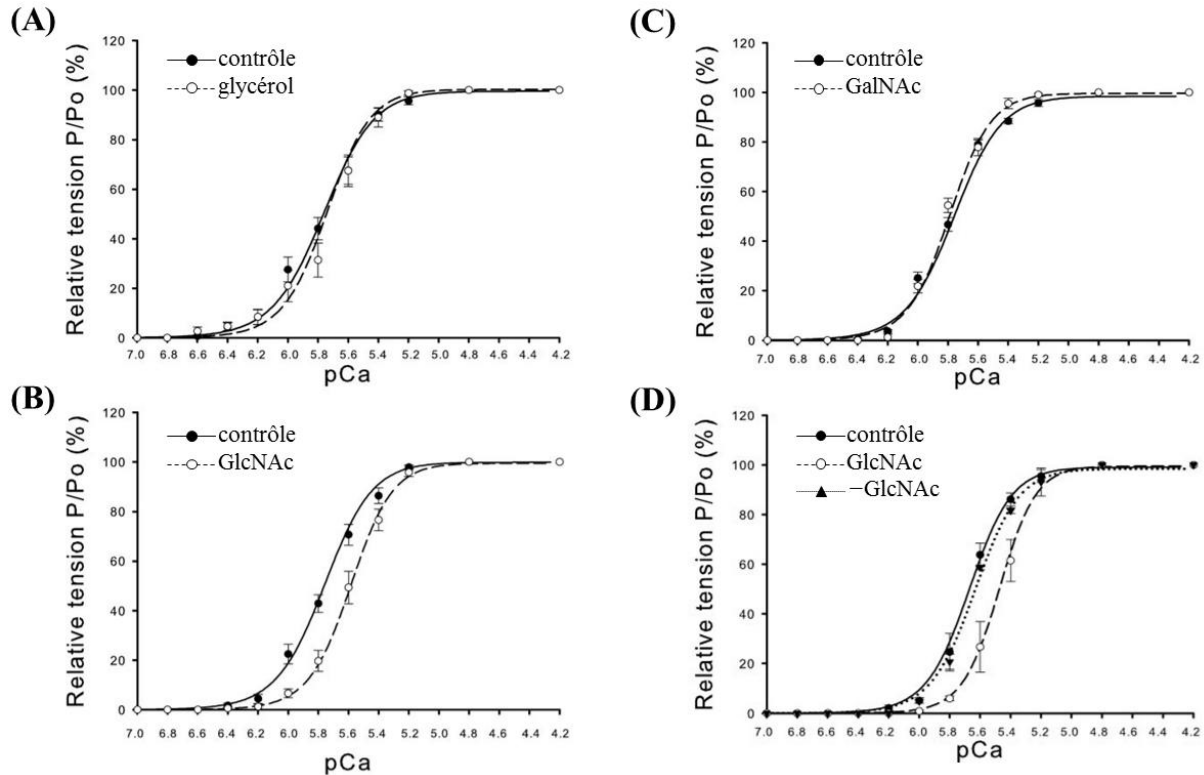


Figure 50 : Propriétés d'activation calcique de fibres musculaires lentes isolées du soléaire en présence de GlcNAc libre, de glycérol ou de GalNAc. (A) Effet d'une solution de 0.2 M de glycérol. (B) Effet d'une solution de 0.2 M de GlcNAc. (C) Effet d'une solution de 0.2 M de GalNAc. (D) Réversibilité de l'effet GlcNAc sur les propriétés d'activation calcique. (modifié d'après Hedou et al., 2007).

L'incubation des fibres musculaires en présence d'une solution de N-acétyl-D-glucosamine induit donc des modifications des propriétés d'activation calciques de la fibre musculaire. Nous avons vérifié s'il existait une éventuelle perte de protéines motrices ou régulatrices de la contraction. Les profils protéiques sont identiques entre les fibres contrôles et les fibres incubées en présence de glycérol, de GalNAc ou de GlcNAc (figure 51): il n'y a donc aucune perte détectable de protéines au niveau des fibres musculaires.

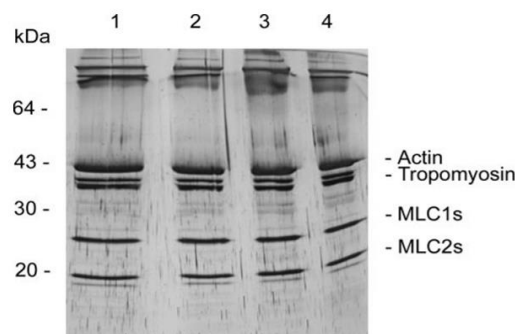


Figure 51 : Profils protéiques des fibres musculaires incubées dans des solutions de GalNAc, de GlcNAc ou de glycérol. Fibres lentes de soléaire non incubées (1), ou incubées dans une solution de GalNAc (2), de GlcNAc (3), ou de glycérol (4). (d'après Hedou et al., 2007).

2.3. Effets d'une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur les propriétés d'activation calcique du soléaire.

Nous avons augmenté le taux global de O-GlcNAcylation dans les fibres de soléaire à partir d'une organo-culture, par l'utilisation de deux inhibiteurs de l'OGA : la PUGNAc et le Thiamet G (voir figure 52). Le muscle soléaire a été choisi du fait (i) de sa topologie, et (ii) de sa forte capacité d'adaptation lors de l'immobilisation ou de conditions physiopathologiques. Comme on peut le voir figure 52C-D, les deux inhibiteurs induisent une augmentation du taux de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires de l'ordre de 50%. Nous avons également déterminé que **le traitement de la biopsie de soléaire par la PUGNAc ou le Thiamet G induisait une augmentation significative de la pCa₅₀, traduisant donc une augmentation de l'affinité calcique** (figure 52A-B). En revanche, ni le seuil d'activation calcique, ni les coefficients de Hill ne sont modifiés ; la sensibilité calcique et la coopérativité des protéines au sein du filament fin ne sont donc pas modifiées par une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation. La tension maximale (développée à la pCa_{4.2}) reste stable également.

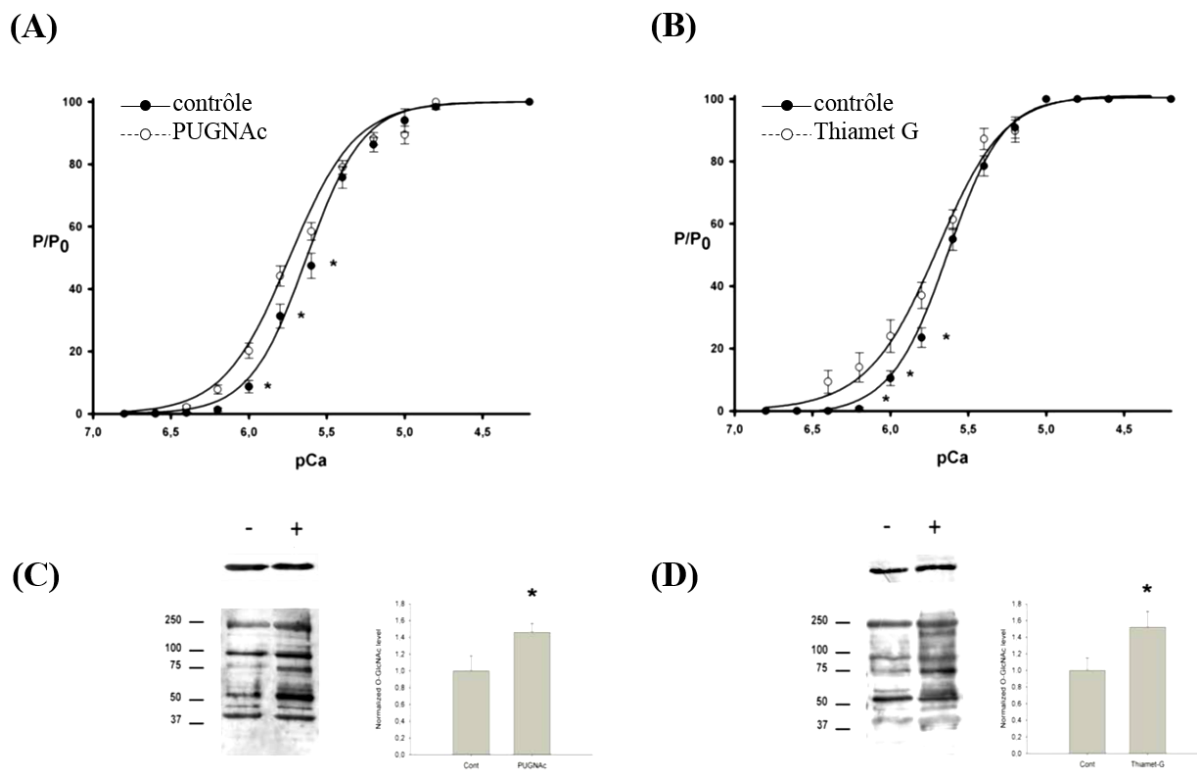


Figure 52 : Effet de l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur les propriétés d'activation calcique de fibres de soléaire. (A-B) Relation T/pCa des fibres de soléaire après traitement par la PUGNAc (A) ou le Thiamet G (B). (C-D) Variation du taux global de O-GlcNAcylation des fibres pelées de soléaire après traitement de la biopsie par la PUGNAc (C) ou le Thiamet G (D). (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2012).

Afin d'identifier un candidat potentiellement impliqué dans ces variations de propriétés d'activation calcique, nous avons identifié si des protéines de la machinerie contractile présentaient une augmentation de leur taux de O-GlcNAcylation. Nous avons ainsi

analysé la variation de O-GlcNAcylation au niveau des protéines motrices (actine, myosine), des isoformes lentes et rapides des protéines régulatrices de la contraction (TnI, TnT, tropomyosine, MLC1, MLC2), mais également de protéines clé structurales (actinine, desmine). Les résultats sont présentés figure 53.

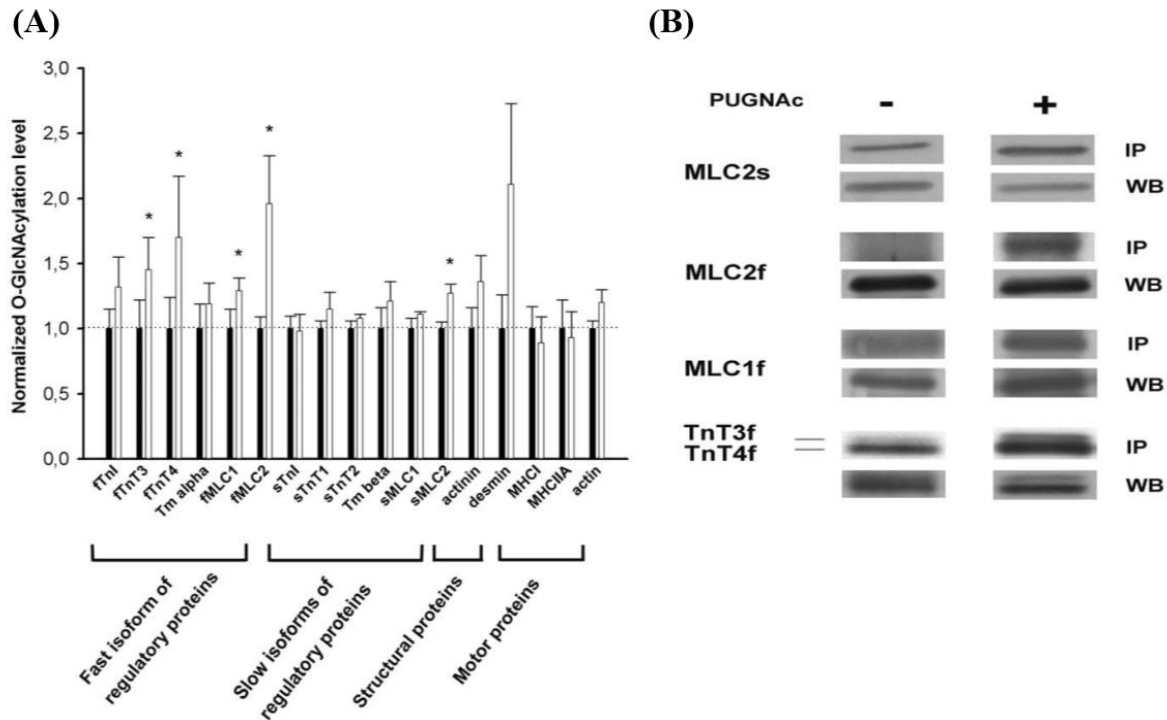


Figure 53 : Quantification de la variation de O-GlcNAcylation des protéines contractiles après traitement de biopsies de soléaire par la PUGNAc. (A) Quantification de la variation de O-GlcNAcylation des protéines motrices et régulatrices de la contraction, ainsi que de deux protéines structurales. Les données sont exprimées comme le ratio du signal obtenu après immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées et le signal d'expression totale de la protéine concernée. (B) Image représentative des signaux de western blot des protéines présentant une variation significative de leur taux de O-GlcNAcylation. (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2012).

Nous avons mesuré une augmentation significative de la O-GlcNAcylation des isoformes rapides de la TnT (fTnT3 et fTnT4), de la MLC1 (MLC1f) et de la MLC2 (MLC2f). En revanche, concernant les isoformes lentes des protéines contractiles et régulatrices de la contraction, isoformes prédominantes dans le muscle lent soléaire, seule la MLC2 (MLC2s) présentait une augmentation significative de son taux de O-GlcNAcylation. Ces résultats nous indiquent que les isoformes rapides des protéines régulatrices de la contraction semblent donc plus sensibles à la variation de O-GlcNAcylation. Cependant, ces isoformes ne sont pas les isoformes majeures exprimées dans le soléaire ; en effet, seules 16% des fibres du soléaire sont des fibres rapides (Delp & Duan, 1996). De plus, toutes les fibres analysées lors de nos expériences de mesure des propriétés d'activation calcique étaient des fibres lentes ; or, ces fibres lentes n'expriment que des isoformes lentes des protéines contractiles et régulatrices de la contraction, comme on peut le voir figure 54 pour la MLC2 ou la TnT. Nous en avons donc conclu que **les changements des propriétés d'activation calcique résultant de l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation ne pouvaient qu'être liés aux isoformes lentes des protéines contractiles et régulatrices de la contraction.**

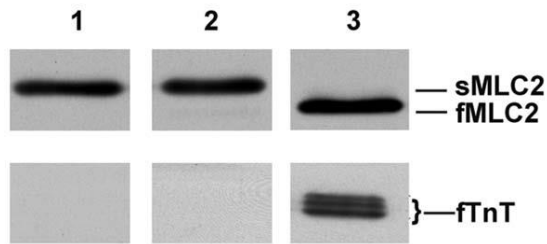


Figure 54 : Expression de protéines régulatrices de la contraction dans des fibres lentes ou rapides. Les signaux sont obtenus par western blot afin de détecter l'expression de la sMLC2, la fMLC2 et des isoformes de fTnT dans des fibres lentes de soléaire non traitées (1), des fibres lentes de soléaire après traitement de la biopsie par la PUGNAc (2), ou de fibres rapides isolées de l'épitroclearis (3) (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2012).

Dans notre étude, seule la sMLC2 présentait une augmentation significative de son taux de O-GlcNAcylation, et devenait par là-même notre seule protéine candidate pouvant expliquer ces modulations des propriétés d'activation calcique. Il est également important de souligner qu'une autre protéine régulatrice de la contraction pourrait potentiellement être impliquée dans ces changements de propriétés d'activation calcique : la troponine C. Cependant, nous n'avons jamais identifié la TnC comme étant O-GlcNAcylée, quelles que soient nos approches expérimentales utilisées. Il faut également noter qu'aucune donnée bibliographique ne nous indique qu'elle soit glycosylée dans le muscle cardiaque. Il est cependant envisageable que l'éventuelle modification de la TnC par la O-GlcNAcylation soit en-dessous du seuil de détection.

3. O-GlcNAcylation et protéines contractiles : focus sur la sMLC2.

3.1. Revue de littérature : la MLC2 et sa modification par la phosphorylation.

3.1.1. Structure et fonction de la MLC2.

Au niveau de la myosine sarcomérique (myosine II), quatre chaînes légères sont liées de manière non covalente aux deux chaînes lourdes (figure 55). Deux sous-familles de chaînes légères, dont les masses moléculaires varient de 16 à 22 kDa, existent : les chaînes légères essentielles ou MLC1 (ELC, Essential Light Chain), et les chaînes légères régulatrices ou MLC2 (RLC, Regulatory Light Chain) (Gordon et al., 2000). Il existe une grande spécificité d'expression des isoformes de MLC1 et de MLC2 selon les tissus musculaires considérés, mais également selon le type de fibres musculaires (Schiaffino & Reggiani, 2011). Les MLC1 et MLC2 possèdent quatre domaines putatifs EF-hand, et appartiennent à la superfamille des calmodulines. Les quatre domaines de la MLC1 ont perdu leur activité de Ca^{2+} -binding, et n'ont donc pas de fonction relevante dans le contexte de la régulation calcique de la contraction musculaire. En revanche, les MLC2 ont conservé un domaine « actif » de liaison au calcium, équivalent à celui retrouvé au niveau de la troponine C (Berchtold et al., 2000) ; ce site Ca^{2+}/Mg^{2+} n'est pas impliqué dans la contraction musculaire, pendant laquelle il est préférentiellement occupé par l'ion Mg^{2+} . En revanche, il peut être occupé lors d'une élévation prolongée de la concentration de Ca^{2+} , par exemple lors du tétanos.

Les chaînes légères régulatrices sont localisées au niveau de la jonction tête-queue des MHC, stabilisant la zone charnière de la MHC (Houdusse & Cohen, 1996) (figure 55). Ces MLC2 sont liées de manière non covalente à la molécule de MHC, à la fois par leurs

domaines N- et C-terminal. Le domaine de liaison des MLC2 aux MHC peut subir des changements conformationnels d'inclinaison et de torsion, jouant un rôle important dans la génération de force (Rayment et al., 1993a ; Rayment et al., 1993b ; Ritz-Gold et al., 1980 ; Uyeda et al., 1996). Diverses études ont également montré que les MLC2 seraient impliquées dans la cinétique des cycles des ponts actine-myosine. En effet, l'absence de MLC2 conduisant à une diminution de la tension développée à des concentrations sous-maximales de calcium (Szczena et al., 1996) et à un ralentissement de formation des ponts acto-myosine (Lowey et al., 1993). Il est à noter que le site de liaison des cations bivalents est localisé au niveau du domaine N-terminal, suggérant que ce site de fixation $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ pourrait influencer sur la liaison des MLC2 aux MHC, entraînant alors des effets sur le cycle des ponts actine-myosine (Szczena, 2003). La MLC2 entre également en jeu pour la modulation de la force générée par la fibre musculaire en fonction de la concentration calcique (Perrie et al., 1973). Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de la phosphorylation de la MLC2 ; je développerai ce point dans le paragraphe ci-après.

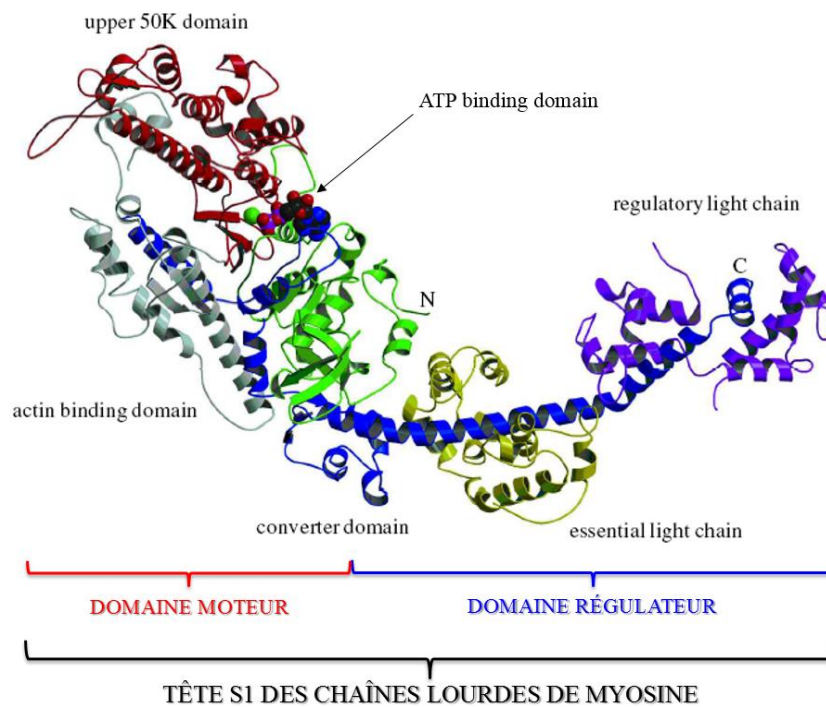


Figure 55 : Structure de la tête S1 de myosine. La tête S1 de myosine peut générer plusieurs fragments protéolytiques : le fragment N-terminal de 25 KDa (en vert ; le fragment de 50 KDa, constitué lui-même de deux domaines (un domaine où se fera la fixation de l'ATP (en rouge), et un domaine de liaison à l'actine (en gris)) ; et un fragment C-terminal de 20 kDa (en bleu). Au niveau de ce domaine régulateur sont localisées les chaînes légères de myosine : une chaîne légère régulatrice (en mauve), et une chaîne légère essentielle (en jaune). (d'après Holmes & Geeves, 2000).

3.1.2. Rôles de la phosphorylation de la MLC2.

Tandis que la phosphorylation de la MLC2 est indispensable au déclenchement de la contraction musculaire dans le muscle lisse, elle est régulatrice de la contraction musculaire dans le muscle strié. Dans le muscle squelettique, un seul site de phosphorylation de la MLC2 a été identifié, en position N-terminale, correspondant au résidu de sérine 14 pour l'isoforme

lente, ou la sérine 15 pour l'isoforme rapide (Blumenthal & Stull, 1980). Cependant, certaines études, basées sur la séparation des MLC2 par électrophorèse bidimensionnelle, ont révélé différents variants de la MLC2s, notés MLC2s, MLC2s1 et MLC2s2, assimilés à la forme non phosphorylée, monophosphorylée et biphosphorylée respectivement (Bozzo et al., 2003 ; Gonzalez et al., 2002) ; la localisation de ce second site de phosphorylation n'est cependant décrite dans aucune donnée bibliographique. Dans le muscle strié, la phosphorylation de la MLC2 est effectuée par la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) au niveau de la Ser14 ou de la Ser15 (dans le muscle lent ou le muscle rapide, respectivement), tandis que le déphosphorylation est le fait de la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) (figure 56). Il semblerait qu'une kinase autre que la MLCK soit impliquée dans la phosphorylation de la MLC2 sur le second site (Zhi et al., 2005).

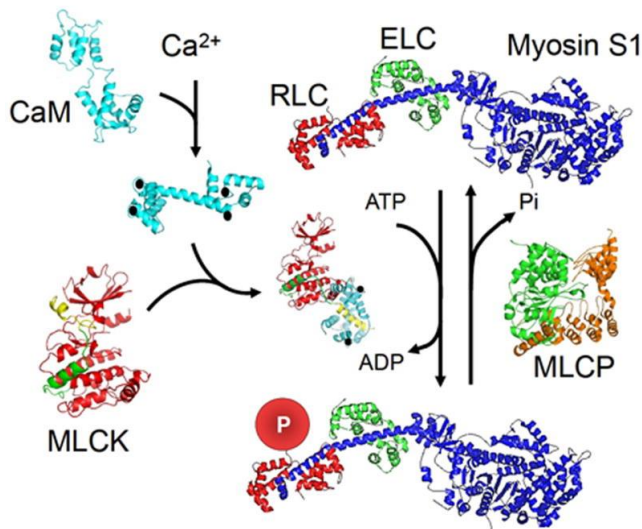


Figure 56 : Phosphorylation de la MLC2 dans le muscle strié. Le transfert du groupement phosphate sur la MLC2 (RLC) localisée au niveau de la tête S1 de myosine (en bleu) est effectué par la MLCK (en rouge) en présence de la calmoduline (en turquoise) et de calcium. La réaction de déphosphorylation est assurée par la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) (en vert et orange). (d'après Stull et al., 2011).

Dans le muscle squelettique, la MLCK, codée par le gène *MYLK2*, est une kinase substrat-spécifique, phosphorylant uniquement et strictement les MLC2, et étant plus exprimée dans les muscles rapides que dans les muscles lents (Kamm & Stull, 2001 ; Zhi et al., 2005). Elle fonctionne selon un mécanisme bi-bi-aléatoire (Geuss et al., 1985). Cette kinase est constituée d'un domaine catalytique, et d'un segment régulateur lui-même composé d'un domaine autoinhibiteur (en vert sur la figure 56) et d'un domaine de liaison de la calmoduline (en jaune sur la figure 56) (Kamm & Stull, 2011) ; la MLCK est donc une protéine Ca^{2+} / Calmoduline dépendante. En l'absence d'ions Ca^{2+} , la calmoduline n'est pas liée à la kinase, et le segment inhibiteur va bloquer stériquement le domaine catalytique de la MLCK. En revanche, lorsque le calcium est libéré du réticulum sarcoplasmique, il va se fixer aux quatre sites de liaison sur la calmoduline, qui pourra alors se fixer à la MLCK et déplacer le segment inhibiteur ; ainsi, lors de la contraction musculaire, la MLCK va pouvoir phosphoryler la MLC2 (Kamm & Stull, 2011 ; Padre & Stull, 2000 ; Stull et al., 2011). La phosphorylation de la MLC2 dépend de la fréquence de stimulation du muscle, et peut passer d'un taux basal de 0-10% de MLC2 phosphorylée à 50-60% de MLC2 phosphorylée (Manning & Stull, 1982) ; ainsi, lors de la stimulation d'un muscle rapide permettant de produire une contraction unique et soutenue (tétanos), la phosphorylation de la MLC2 augmente de manière importante. Cependant, même à des fréquences basses de stimulation, permettant des contractions rapides mais transitoires (secousses musculaires), la MLC2 est

phosphorylée de manière dépendante du temps de la stimulation et de la fréquence (Moore & Stull, 1984). La réaction de phosphorylation est plus lente que ne l'est la contraction, et en réalité, l'augmentation de phosphorylation est faible durant la première seconde de stimulation (Ryder et al., 2007) ; ce phénomène est lié au fait que les événements moléculaires liés à la fixation du Ca^{2+} sur la troponine C sont plus rapides que la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline/MLCK. En parallèle, le taux de dissociation du Ca^{2+} de la calmoduline est lent, ce qui conduit à une action prolongée de la MLCK, qui se poursuit à la recapture du Ca^{2+} myoplasmique. La phosphorylation de la MLC2 est donc maintenue plusieurs secondes après la relaxation suivant une brève contraction tétanique, assurant donc un effet « mémoire » une fois les fibres relaxées ; pendant ce laps de temps, la MLCK va s'inactiver lentement.

La déphosphorylation de la MLC2 est liée à la protéine phosphatase de type 1 (PP1), correspondant à la sous-unité catalytique de la MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase). L'isoforme PP1 β (ou PP1 γ) est la Ser/Thr phosphatase impliquée dans la déphosphorylation de la MLC2 ; cette phosphatase exerce son activité sur une multitude de substrats cellulaires, et sa spécificité vis-à-vis de la MLC2 lui est conférée par une sous-unité régulatrice avec laquelle elle interagit, correspondant à MYPT2 (MYosin Phosphatase Target 2) (Damer et al., 1998 ; Fujioka et al., 1998 ; Moorhead et al., 1998). L'interaction entre la sous-unité catalytique PP1 et la sous-unité régulatrice MYPT2 permet la déphosphorylation spécifique de la MLC2 dans le muscle squelettique (figure 56).

La phosphorylation de la MLC2 n'a pas d'effet significatif sur l'activité ATPase de la myosine, mais va plutôt changer les propriétés des ponts acto-myosine, résultant en une modulation de la contraction Ca^{2+} /troponine-dépendante (Kamm & Stull, 2011). Il a en effet été démontré que l'augmentation de la phosphorylation de la MLC2 était associée à une augmentation de la force développée par la fibre musculaire à des concentrations sous-maximales de Ca^{2+} , mais pas lors de l'activation calcique maximale (décalage vers la gauche de la relation tension/pCa) (Metzger et al., 1989 ; Persechini et al., 1985 ; Sweeney et al., 1993 ; Sweeney & Stull, 1986). En revanche, elle n'a aucun effet sur la vitesse maximale de raccourcissement des fibres musculaires (Persechini et al., 1985 ; Sweeney & Stull, 1986). L'augmentation de la sensibilité calcique médiée par la phosphorylation de la MLC2 est proportionnelle à l'activité myosine ATPase, suggérant que le mécanisme moléculaire impliqué dans cet effet soit lié à une augmentation du nombre de ponts acto-myosine formés avec le filament fin, plutôt qu'à une augmentation de la force par cycle acto-myosine *per se* (Sweeney & Stull, 1990). Il a été mis en évidence que lorsque la MLC2 était phosphorylée, il existait une réorganisation des myofilaments par rapport à leur état de repos (c'est-à-dire en condition non phosphorylée) (Levine et al., 1996 ; Levine et al., 1998 ; Yang et al., 1998). L'addition d'une charge négative modifie l'organisation des têtes de myosine au niveau du filament épais, et conduit à une réorientation de ces têtes de myosine, qui vont s'éloigner de la surface du filament épais pour se rapprocher du filament fin d'actine, diminuant donc la distance entre les filament fin et épais (figure 57). Ainsi, la phosphorylation de la MLC2 va diminuer la distance interfilamentaire après une contraction musculaire, augmentant l'intensité de l'interaction actine-myosine lors du retour à de faibles concentrations calciques (MacIntosh, 2003).

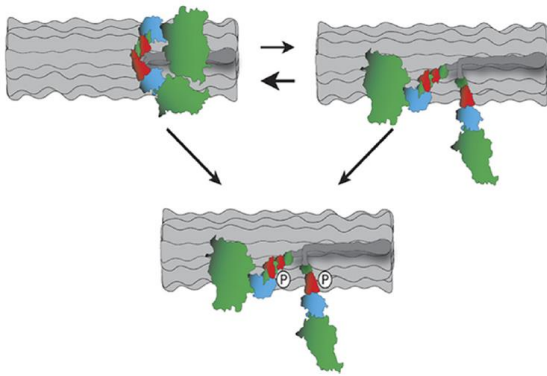


Figure 57 : Effet de la phosphorylation de la MLC2 sur le positionnement des têtes de myosine. Les têtes de myosine (en vert) renferment des chaînes légères essentielles (en bleu) et régulatrices (en rouge), avec un aspect replié au repos, ou un aspect plus étiré où les têtes de myosine s'éloignent du filament épais lors de la contraction. La phosphorylation de la MLC2 induit une augmentation de la mobilité des têtes de myosine, qui s'éloignent du filament épais pour se rapprocher des filaments fins. (d'après Kamm & Stull, 2011).

Si on découpe le cycle des ponts actine-myosine en deux états « pas de force générée » et « génération de force » (Brenner, 1988), l'action de la phosphorylation de la MLC2 aurait pour effet d'augmenter la cinétique de passage de l'état « pas de force générée » à l'état « génération de force » du cycle des ponts actine-myosine (Sweeney & Stull, 1990). Il y a donc un phénomène de potentialisation de la contraction *via* la phosphorylation de la MLC2, qu'il s'agisse d'un muscle lent ou d'un muscle rapide ; l'amplitude de la potentialisation à des concentrations calciques sous-maximales est inversement proportionnelle à la distance entre le filament épais et le filament fin (Yang et al., 1998). Ainsi, le signal calcique, qui initie le développement de la force, va également déclencher, par l'intermédiaire de l'activation de la MLCK et la phosphorylation de la MLC2, un mécanisme « mémoire » permettant de faciliter ou d'améliorer la fonction musculaire mécanique lors d'une activité prolongée ou répétitive. C'est ce que l'on appelle potentialisation post-tétanique (PTP), définie comme l'augmentation de force isométrique consécutive à une stimulation tétanique (Klug et al., 1982 ; Rassier & MacIntosh, 2000 ; Vandenboom et al., 1995). Cette PTP est rencontrée lors de la fatigue musculaire ; ainsi, la phosphorylation de la MLC2 peut moduler la réponse musculaire lors de bas niveau de fatigue, en participant à l'augmentation de la force isométrique à des niveaux modérés de fatigue (Gittings et al., 2011). Cet effet de potentialisation est plus marqué pour les muscles rapides que pour les muscles lents ; la PTP est particulièrement marquée pour les fibres IIB, qui sont les fibres les plus rapides (Ryder et al., 2007).

3.2. Localisation de sites modifiés par la O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2.

Au cours de ma thèse, j'avais tenté de localiser le(s) site(s) de O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2 ; ces résultats n'ont cependant pas été publiés. La technique que j'avais alors utilisée est très différente de celle que j'ai détaillée dans le chapitre I « O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques ». Cette méthode, décrite par Roquemoire (Roquemoire et al., 1994), est représentée schématiquement figure 58.

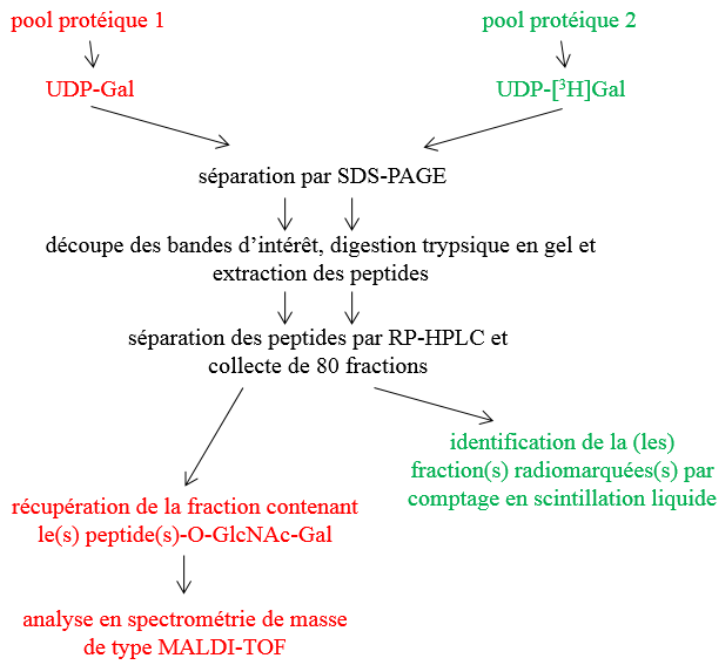


Figure 58 : Méthodologie appliquée pour la localisation des sites de O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2s. En rouge correspond la méthodologie appliquée sur l'extrait protéique marqué au galactose « froid », en vert celle appliquée sur l'extrait protéique radiomarké par du galactose tritié, et en noir la méthodologie commune aux deux extraits protéiques.

Nous avons ainsi identifié **deux peptides présentant un incrément de masse correspondant au motif GlcNAc-Gal** par rapport aux peptides non modifiés, indiqués en vert sur la figure 59. Au sein de ces deux peptides sont présents plusieurs résidus de sérine et de thréonine pouvant potentiellement être les sites modifiés par la O-GlcNAcylation. Nous n'avons pu localiser précisément les sites modifiés, mais uniquement les peptides porteurs de la O-GlcNAcylation. Ainsi, les sites pouvant être O-GlcNAcylés sont les sérines 14, 15, 19 ou la thréonine 24 pour le peptide O-GlcNAcylé en N-terminal, ou les thréonines 124 ou 125 pour le second peptide glycosylé. Il est intéressant de noter que les résidus de thréonine sont localisés dans des domaines EF-hand. Un seul site est décrit dans la littérature, correspondant à la sérine 14 (figure 59) (Ramirez-Correa et al., 2008) ; en revanche, il n'y a pas de second site décrit.

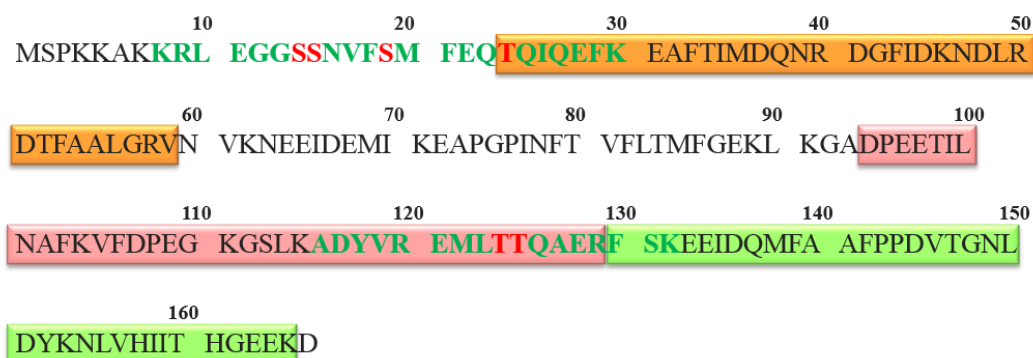


Figure 59 : Localisation des sites de O-GlcNAcylation sur la MLC2s. Au niveau de la séquence de la protéine (numéro d'accès UniProtKB : P08733) sont indiqués les motifs structuraux EF-Hand (encadrés). En vert sont indiqués les peptides identifiés comme glycosylés, et en rouge les sérines et les thréonines potentiellement O-GlcNAcylées.

3.3. Variation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la sMLC2 au cours de l'atrophie fonctionnelle.

3.3.1. Problématique.

Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation de la MLC2 induit une augmentation de la sensibilité calcique dans le muscle squelettique (Kamm & Stull, 2011 ; MacIntosh, 2003 ; Persechini et al., 1985 ; Sweeney et al., 1993 ; Szczesna et al., 2002). Pourtant, au cours du vieillissement ou lors de la réduction d'activité (par exemple lors de l'hypodynamie-hypokinésie), la phosphorylation de la MLC2 augmente, alors qu'en parallèle, la sensibilité calcique diminue (Bozzo et al., 2003 ; Gannon et al., 2008). La diminution de la sensibilité calcique mesurée dans ces deux modèles d'atrophie semble donc en contradiction avec la phosphorylation de la MLC2 observée. Or, certains de nos travaux ont étroitement lié sensibilité calcique et O-GlcNAcylation de la MLC2. Nous avons donc entrepris de déterminer s'il existe une dynamique entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2s lors de l'atrophie fonctionnelle induite par l'hypodynamie-hypokinésie (HH) chez le rat. Cette dynamique pourrait jouer un rôle dans la diminution de sensibilité calcique observée dans le muscle atrophié.

Le modèle d'HH (ou HU : Hindlimb Unloading) est un modèle largement utilisé pour induire une atrophie fonctionnelle au niveau des muscles posturaux qui ne sont plus sollicités, en mimant les effets de l'absence de pesanteur sur le système musculo-squelettique de rat (Morey et al., 1979). Dans ce modèle, le train postérieur des animaux est surélevé pendant une période de 14 ou de 28 jours, afin que les pattes postérieures ne supportent plus le poids de l'animal ; le système musculosquelettique des membres inférieurs se trouve en hypodynamie (absence de charge corporelle) et en hypokinésie (réduction des activités motrices), d'où la dénomination d'hypodynamie-hypokinésie. Trois groupes d'animaux ont été considérés dans notre étude : un groupe d'animaux témoins (C, control) ; un groupe HU (Hindlimb Unloading), dans lequel les animaux ont été soumis à l'HH pendant une durée de 14 jours ; un groupe R (R, recovery), dans lequel les animaux ont été soumis à une HH de 14 jours, suivie d'une phase de récupération de 14 jours.

3.3.2. Variation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la sMLC2.

3.3.2.1. Phosphorylation et O-GlcNAcylation antagonistes au niveau de la MLC2s ?

Une approche classique de quantification de la variation de O-GlcNAcylation d'une protéine d'intérêt, ici la MLC2s, est d'immunoprécipiter les protéines-O-GlcNAcylées, puis de détecter la protéine d'intérêt par western blot. Concernant la variation de phosphorylation, la méthode la plus simple est d'effectuer un western blot avec un anticorps dirigé contre le phospho-épitope de la protéine d'intérêt. Cependant, aucun anticorps dirigé contre la phospho-MLC2s n'est disponible commercialement. Afin de quantifier la variation de phosphorylation de la MLC2, il était possible d'utiliser une approche par électrophorèse bidimensionnelle, permettant de différencier les formes phosphorylées et non phosphorylées d'une protéine par le shift en terme de point isoélectrique (Bozzo et al., 2003 ; Bozzo et al.,

2005 ; Stevens et al., 2013). Cependant, cette approche est assez lourde à mettre en œuvre, surtout pour un nombre élevé d'échantillons à analyser. J'ai alors entrepris de mettre en place au laboratoire une méthode permettant de séparer les formes mono-, di-, (...) - phosphorylées de la forme non phosphorylée par électrophorèse monodimensionnelle, basée sur l'utilisation du Phos-tagTM acrylamide. Le Phos-tagTM, en formant un complexe avec un ion métallique bivalent (complexe 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato dizinc(II)), devient une molécule sélective de liaison aux groupements phosphates, en solution aqueuse et à pH neutre (Takeda et al., 2003). Depuis, de nombreux dérivés de ce Phos-tagTM ont été développés, tels que le Phos-tagTM agarose, le Phos-tagTM biotine, ou encore le Phos-tagTM acrylamide, ce dernier permettant de séparer par SDS-PAGE des protéines selon le nombre de groupements phosphate (Kinoshita et al., 2006 ; Kinoshita et al., 2009 ; Kinoshita & Kinoshita-Kikuta, 2011). Ainsi, comme on peut le voir figure 60A, l'addition de Phos-tagTM acrylamide dans le gel permet de visualiser, après western blot, deux bandes pour la MLC2 dans les conditions C1 et C2, avec, dans cet exemple, une phosphorylation plus importante dans la condition C2. Le traitement de l'échantillon par la phosphatase alcaline (PA) conduit à la disparition de la bande retardée, correspondant donc à la forme phosphorylée.

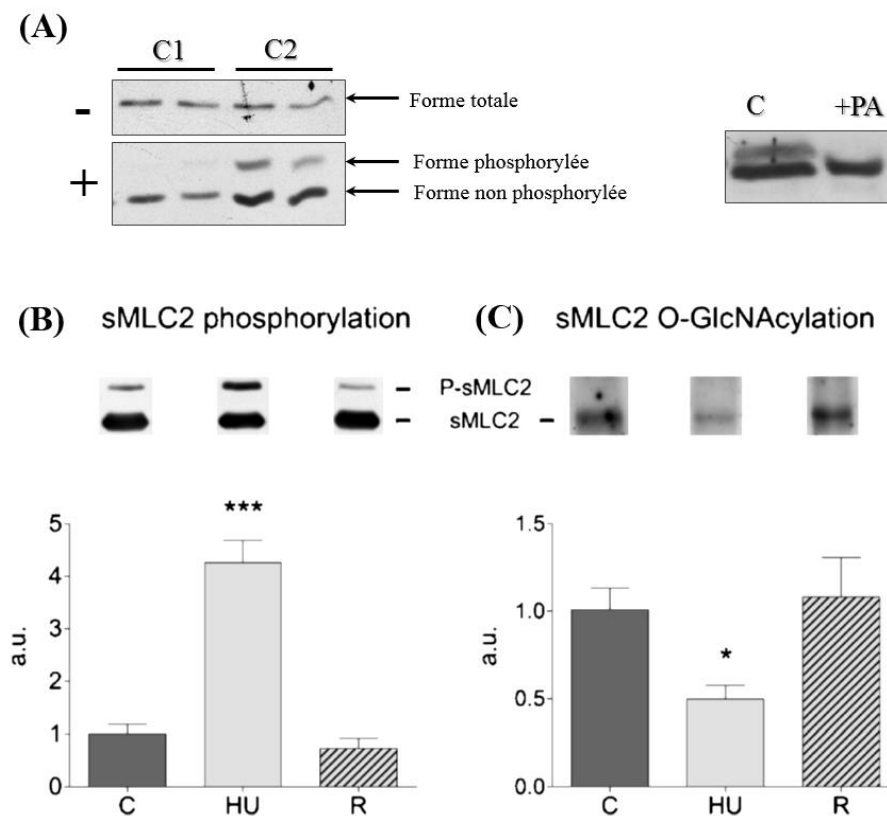


Figure 60 : Séparation des formes phosphorylées et non phosphorylées de la MLC2 par SDS-PAGE. (A) Profil électrophorétique de la MLC2 par SDS-PAGE en l'absence (-) ou en présence (+) de Phos-tagTM acrylamide entre deux conditions expérimentales C1 et C2, ou après traitement de l'échantillon par la phosphatase alcaline (+PA). (B) Quantification de la variation de phosphorylation de la MLC2s lors de l'hypodynamie-hypokinésie (HU, Hindlimb Unloading) ou après la phase de récupération (R). (C) Quantification de la variation de O-GlcNAcylation de la MLC2s lors de l'hypodynamie-hypokinésie (HU) ou après la phase de récupération (R). (modifié d'après Cieniewski-Bernard et al., 2014b).

Nous avons donc quantifié la variation de phosphorylation de la MLC2s par l'intermédiaire du Phos-tagTM acrylamide. Nous avons également entrepris de quantifier la variation de O-GlcNAcylation de la MLC2s après immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées, séparation électrophorétique par Phos-tagTM acrylamide et détection de la MLC2s par western blot. Cette approche nous permettait ainsi de quantifier la variation de O-GlcNAcylation sur la forme non phosphorylée de la MLC2s, mais également sur la(les) forme(s) phosphorylée(s). Comme on peut le voir sur la figure 60B, deux bandes sont visualisées après séparation électrophorétique sur gel de Phos-tagTM acrylamide, correspondant donc à la forme non phosphorylée (non retardée) et à la forme (mono-) phosphorylée de la MLC2s. Nous n'avons pas détecté de seconde bande retardée, même après surexposition des films photographiques. Après HH, nous avons quantifié une augmentation du taux de phosphorylation d'un facteur 4 environ, et un retour vers les valeurs contrôles lors de la récupération. Concernant la variation de O-GlcNAcylation de la MLC2s, nous avons déterminé que le taux de glycosylation diminuait de moitié après l'HH, et, tout comme la phosphorylation, était réversible puisque le taux de O-GlcNAcylation revenait à des valeurs contrôle après la phase de récupération (figure 60C).

Nous avons également mis en évidence par chromatographie d'affinité (permettant d'une part de purifier les phosphoprotéines, et d'autre part les protéines O-GlcNAcylées) que la forme glycosylée de la MLC2s correspondait à la forme non phosphorylée de la MLC2s, ce qui suggère que les deux modifications post-traductionnelles sont mutuellement exclusives au niveau de la MLC2s (figure 61), ce qui est supporté par l'identification de la sérine 14 comme le site de phosphorylation et celui de O-GlcNAcylation

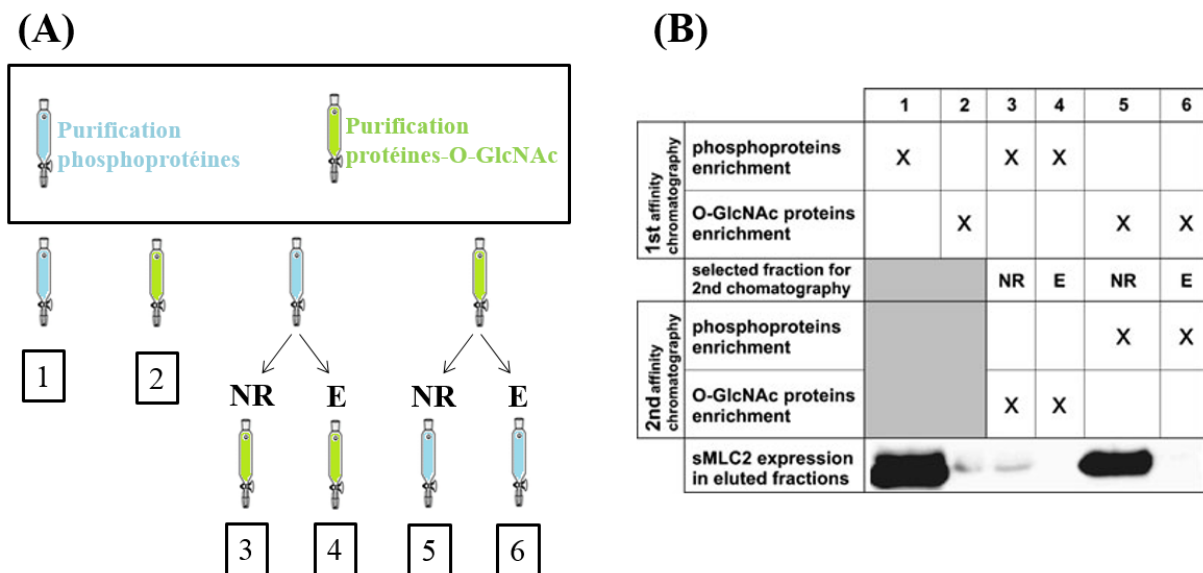


Figure 61 : Caractérisation de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation de la MLC2s par chromatographies d'affinité. (A) Protocole expérimental appliqué dans cette étude. Deux types de chromatographies d'affinité ont été effectués, permettant la purification des phosphoprotéines (en bleu) ou des protéines-O-GlcNAcylées (en vert). (NR : fraction non retenue ; E : éluat). (B) Tableau récapitulatif des données obtenues après 1 ou 2 cycle(s) de chromatographie d'affinité (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2014b).

Ces changements de phosphorylation et de O-GlcNAcylation peuvent en partie résulter de changements d'expression des enzymes impliquées dans cette dynamique de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la MLC2s, à savoir l'OGT et l'OGA pour la O-GlcNAcylation, et la MLCK, PP1 et MYPT2 pour la phosphorylation. Je ne présenterai pas ces données dans ce mémoire. Cependant, il est ici important de souligner que nous avons mis en évidence, par western blot, que chacune de ces enzymes étaient présentes au niveau de la fraction myofilaementaire.

3.3.2.2. Régulation de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation de la MLC2s par un complexe multienzymatique myofilaementaire.

Comme je l'ai souligné précédemment, toutes les enzymes impliquées dans la dynamique de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la MLC2s sont localisées au niveau de la fraction myofilaementaire. Afin de localiser plus précisément ces enzymes, nous avons effectué un marquage de chacune des enzymes pour les visualiser par immuno-fluorescence sur des coupes longitudinales de soléaire de rats contrôle ou soumis à l'HH (figure 62). Comme on peut l'observer figure 62B, toutes ces enzymes présentent une organisation bien structurée, avec un aspect strié rappelant l'organisation structurale sarcomérique.

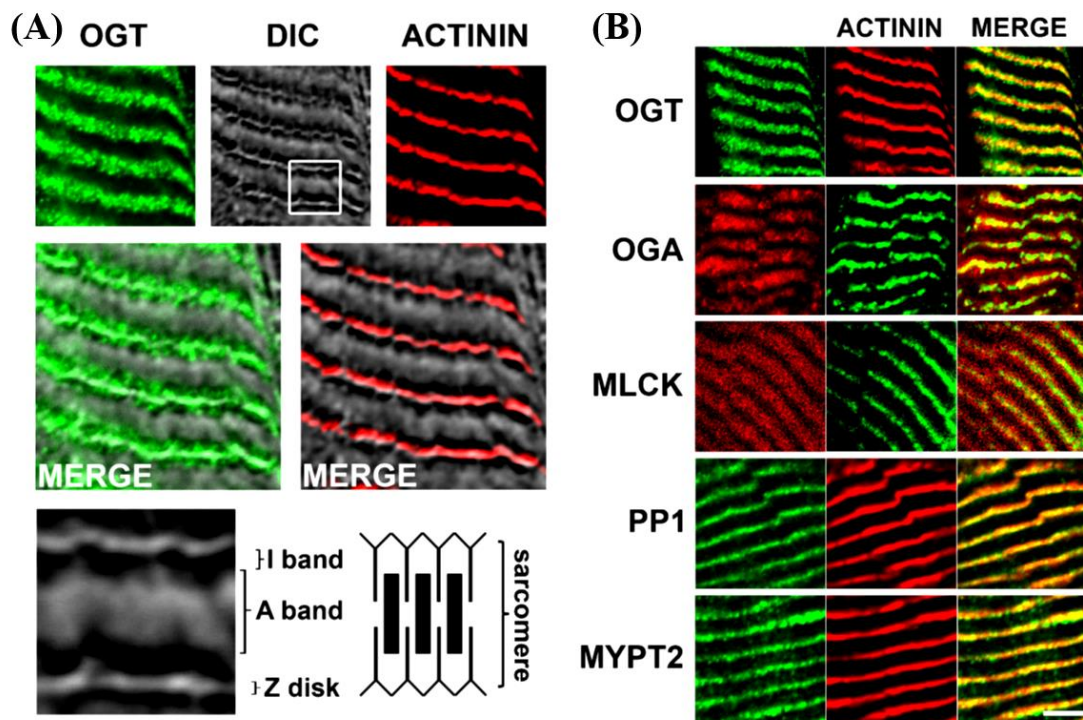


Figure 62 : Localisation des enzymes impliquées dans la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2s au niveau de l'appareil contractile. (A) Marquage de l'OGT (en vert) et de l'actinine (en rouge), et superposition des signaux obtenus avec l'image obtenue en microscopie optique confocale (DIC, Differential Interference Contrast); est également représenté un schéma permettant de visualiser l'alternance des bandes claires et sombres à partir de l'image DIC. (B) Co-marquage de l'OGT, l'OGA, la MLCK, PP1 et MYPT2 avec l'actinine. L'échelle correspond à 5 µm. (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2014b).

Nous avons également localisé de manière plus précise ces enzymes ; les données concernant l'OGT sont représentée figure 62A. Nous avons ainsi localisé précisément l'OGT au niveau de la strie Z et des bandes I. De la même manière, nous avons localisé les autres enzymes impliquées dans la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2s. L'OGA et la MLCK présente la même localisation au niveau de l'appareil contractile, à savoir la strie Z et la bande I, avec une localisation un peu plus diffuse sur la bande A. En revanche, PP1 et MYPT2 sont préférentiellement localisées au niveau de la strie Z.

Nos résultats démontrent que ces différentes enzymes ont une localisation assez similaire au niveau du sarcomère et qu'il existe un antagonisme entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation pour la MLC2. Nous avons donc entrepris de déterminer si ces enzymes pouvaient interagir au sein d'un complexe multi-enzymatique. Deux stratégies ont été appliquées : (i) par co-immunoprécipitation des enzymes d'intérêt et western blot, et (ii) par marquage par immunofluorescence sur des coupes longitudinales. L'ensemble des résultats obtenus selon l'approche de co-immunoprécipitation et western blot sont présentés figure 63 : **il existe donc bien une interaction entre les différentes enzymes de la glycosylation et de la phosphorylation.** Toutes ces enzymes interagissent également avec la MLC2s, mais nous ne pouvons déterminer s'il s'agit d'interaction directe ou indirecte par cette approche expérimentale.

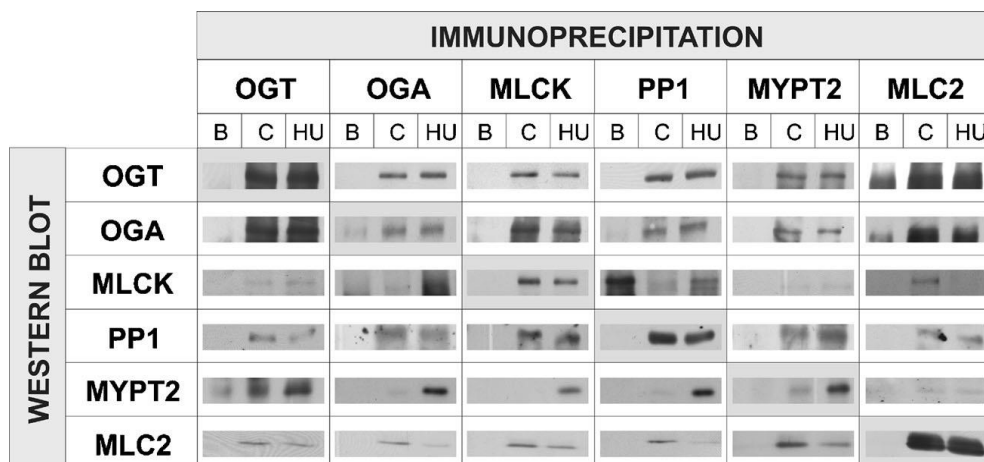


Figure 63 : Caractérisation d'un complexe multienzymatique par co-immunoprécipitation des enzymes d'intérêt, et détection de leurs partenaires protéiques par western blot. Chaque enzyme d'intérêt (OGT, OGA, MLCK, PP1 et MYPT2) a été immunoprécipitée avec ses partenaires protéiques, les enzymes d'intérêt étant révélées par western blot. B : blanc immunoprécipitation ; C : contrôle ; HU : Hindlimb Unloading.

Nous avons également effectués les co-marquages suivants sur des coupes longitudinales de soléaire : OGT/OGA, OGT/PP1, OGT/MLCK, PP1/OGA, PP1/MLCK, MYPT2/OGA, MYPT2/PP1, MYPT2/MLCK, et enfin OGA/MLCK. Pour chacun de ces co-marquages ont été déterminés le coefficient de Manders et le coefficient de Pearson, qui permettent de déterminer le degré de co-localisation entre deux protéines. Les données obtenues démontrent que ces enzymes interagissent entre elles. De manière intéressante, nous avons mis en évidence que **l'interaction entre l'OGA et la MLCK augmentent lors de**

l'HH, puisque nous avons mesuré une augmentation significative des coefficients de Manders (0.888 ± 0.009 à 0.916 ± 0.007 , $p < 0.05$) et de Pearson (0.751 ± 0.021 à 0.839 ± 0.016 , $p < 0.05$) ; les images représentatives de l'interaction OGA/MLCK sont représentées figure 64. **Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de phosphorylation et la diminution de O-GlcNAcylation de la MLC2s lors d'un épisode d'hypodynamie-hypokinésie.**

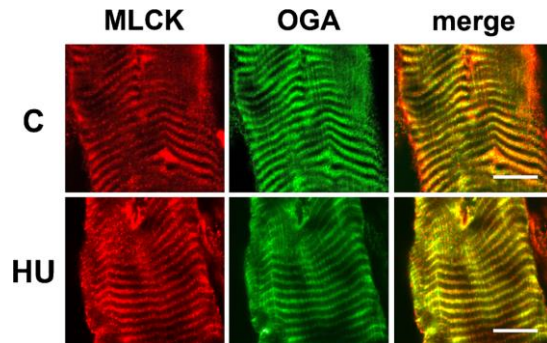


Figure 64 : Modification du degré de corrélation entre la MLCK et l'OGA suite à un épisode d'hypodynamie-hypokinésie. Le marquage de la MLCK et de l'OGA ont été effectués sur des coupes longitudinales de soléaire issus de rats contrôles ou après HU.

Nous avons ainsi démontré dans cette étude que (i) la phosphorylation et la O-GlcNAcylation sont mutuellement exclusive sur la MLC2s, ce qui peut être en lien avec la sérine 14 modifiée par l'une ou l'autre de ces modifications post-traductionnelles ; (ii) lors de l'HH, la phosphorylation augmente tandis que la O-GlcNAcylation diminue ; (iii) ces variations de phosphorylation et de O-GlcNAcylation sont réversibles, et en lien avec la charge appliquée au muscle. Nous avons mis en évidence que (i) l'expression des enzymes impliquées dans cet antagonisme entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2s est modulée lors de l'HH et de la phase de récupération, à la fois au niveau de l'extrait total mais également au niveau de la fraction myofilaementaire ; (ii) toutes ces enzymes présentent une localisation au niveau de l'appareil contractile, notamment au niveau de la strie Z, véritable point nodal pour la signalisation dans le muscle squelettique ; (iii) ces enzymes co-existent au sein d'un complexe multienzymatique ; (iv) l'interaction entre certaines enzymes (notamment l'OGA et la MLCK) sont modulées au cours de l'HH.

4. Discussion & perspectives.

4.1. O-GlcNAcylation et sensibilité calcique.

Nos travaux ont démontré que la O-GlcNAcylation était impliquée dans la régulation de la contraction musculaire, par la modulation des propriétés d'activation calcique (Hedou et al., 2007). En effet, en présence de GlcNAc libre, l'affinité et la sensibilité calciques des fibres de soléaire sont diminuées, tandis que la coopération des protéines au sein du filament fin n'est pas modifiée, ces effets étant réversibles. Cette modulation des propriétés d'activation calcique pourrait impliquer la modulation d'interaction protéine-protéine, ces interactions étant diminuées voire abrogées en présence d'un excès de GlcNAc libre. Peu après la publication de nos travaux, une autre équipe a mis en évidence des données similaires dans le muscle cardiaque, avec notamment une diminution de l'affinité et de la sensibilité calciques lors de l'incubation de fibres en présence de GlcNAc (Ramirez-Correa et al., 2008),

mais sans réversibilité du phénomène ; les auteurs avaient attribué les effets de la GlcNAc à une augmentation du taux de O-GlcNAcylation au niveau de l'actine.

Notre hypothèse est que **la levée des interactions protéine-protéine dépendantes du motif O-GlcNAc entraînerait une modification des propriétés d'activation calcique caractérisées par une diminution de la sensibilité et de l'affinité calcique** tandis que la coopérativité au sein du filament fin n'est pas modifiée. La diminution de la sensibilité calcique observée en présence de N-acétyl-D-glucosamine pourrait résulter d'une levée de l'interaction myosine-MLC2, puisqu'il a été démontré que la perte de la MLC2 diminuait également la sensibilité calcique des fibres musculaires (Szczesna et al., 1996). Cependant, nous n'avons pas observé de perte protéique lorsque les fibres ont été incubées en présence d'un excès de GlcNAc libre. Il est cependant concevable que la MLC2 puisse continuer d'interagir avec la MHC (le domaine N-terminal s'enroulant autour du domaine C-terminal des MHC entre les résidus Asn 825 et Leu 842, et leur domaine C-terminal interagissant avec les MHC entre les résidus Glu 808 et Val 826 (Rayment et al., 1993a ; Rayment et al., 1993b), tandis qu'un autre type d'interaction, cette fois dépendant de la O-GlcNAcylation, soit levé en présence de la N-acétylglucosamine.

Nos travaux ont également permis de démontrer que l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation d'une biopsie de soléaire conduisait à une augmentation de l'affinité calcique (Cieniewski-Bernard et al., 2012) qui pourrait être plus spécifiquement liée à l'augmentation de glycosylation de l'isoforme lente de la MLC2. Ainsi, **une augmentation de la O-GlcNAcylation de la MLC2 pourrait au contraire se traduire par un renforcement de l'interaction myosine-MLC2, et par là-même l'augmentation d'affinité calcique** que nous avons observé lors de l'augmentation de la O-GlcNAcylation de la MLC2. Cependant, les effets de la O-GlcNAcylation de la MLC2 sur la sensibilité calcique des fibres musculaires semblent similaires à ceux induits par la phosphorylation, notamment à des concentrations sous-maximales de calcium, tandis qu'il n'y a pas d'effet aux concentrations maximales. Pourtant, malgré des effets similaires, nous avons démontré que la phosphorylation et la O-GlcNAcylation sont antagonistes au niveau de la MLC2s. Il est donc difficile d'appréhender la logique physiologique de ce mécanisme de régulation.

4.2. O-GlcNAcylation, sensibilité calcique et hypodynamie-hypokinésie.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 3.1. « Revue de littérature : la MLC2 et sa modification par la phosphorylation », de nombreuses études ont montré que la phosphorylation de la MLC2 était associée à une augmentation de la sensibilité calcique des fibres musculaires (Kamm & Stull, 2011 ; MacIntosh, 2003 ; Persechini et al., 1985 ; Sweeney et al., 1993 ; Szczesna et al., 2002). Pourtant, la réduction d'activité physique ou le vieillissement sont associés à une diminution de la sensibilité calcique tandis que la phosphorylation de la MLC2 augmente (Bozzo et al., 2003 ; Gannon et al., 2008). En conséquence, la diminution de la sensibilité calcique observée lors de l'HH ne peut résulter de la variation de phosphorylation, mais pourrait impliquer un autre type de régulation. Nous avons démontré que la O-GlcNAcylation pouvait moduler les propriétés d'activation calcique de fibres musculaires squelettiques (Cieniewski-Bernard et al., 2009 ; Cieniewski-Bernard et

al., 2012 ; Hedou et al., 2007). En particulier, l'augmentation de la O-GlcNAcylation a été associée avec une augmentation de la sensibilité calcique. Ainsi, la diminution de O-GlcNAcylation de la MLC2s observée lors de l'HH pourrait expliquer la diminution de sensibilité calcique lors de l'atrophie fonctionnelle du soléaire. **Les changements de O-GlcNAcylation de la MLC2s semblent donc pouvoir être associés avec la dysfonction contractile, tandis que les modifications de phosphorylation observés lors d'une plasticité musculaire pourraient être associées à des changements phénotypiques** (Bozzo et al., 2003 ; Ricart-Firinga et al., 2000 ; Stevens et al., 2000). Pour mieux comprendre ce mécanisme, il pourrait donc être intéressant de caractériser la modulation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la MLC2s dans certains dysfonctionnements musculaires liés à la sédentarité, au diabète de type II, ou encore au cours de la sarcopénie.

Nous avons également mis en évidence l'existence d'un complexe multienzymatique, regroupant l'OGT, l'OGA, la MLCK, PP1 et MYPT2. L'interaction entre l'OGT et des phosphatases avait déjà été décrite dans la littérature, notamment MYPT1 ou la sous-unité catalytique PP1 (Cheung et al., 2008 ; Wells et al., 2004), conduisant à une augmentation de la O-GlcNAcylation concomitante à la diminution de phosphorylation. Nous avons montré dans cette étude que l'interaction entre l'OGA et des kinases peut également exister puisque l'OGA interagit avec la MLCK, permettant donc la déglycosylation de la MLC2 en parallèle de sa phosphorylation. Des complexes multienzymatiques associant OGT/OGA et kinases/phosphatases ont été mis en évidence dans la régulation du cycle cellulaire (Slawson et al., 2008). De manière intéressante, **il semblerait que l'interaction entre certaines enzymes soit modulée au cours de l'HH, en particulier l'interaction entre l'OGA et la MLCK, permettant ainsi d'expliquer la dynamique et l'antagonisme entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2s.**

Un autre point important découlant de nos travaux est la **localisation de l'OGT et de l'OGA au niveau de la strie Z, véritable point nodal de la signalisation dans le muscle squelettique** ; des données similaires concernant l'OGT et l'OGA ont récemment été mises en évidence dans le muscle cardiaque (Ramirez-Correa et al., 2015). Initialement considéré comme un constituant passif du sarcomère, la strie Z est aujourd'hui considérée comme un point nodal de la signalisation dans le muscle squelettique, servant de point d'ancrage à des protéines cytosquelettiques, des canaux, des protéines apoptotiques, des enzymes et des molécules de signalisation agissant entre le noyau et le myoplasme (Frank et al., 2006 ; Sanger & Sanger, 2008). Or, dans des pathologies du muscle squelettique et du muscle cardiaque, la strie Z est souvent remodelée, et peut être considérée comme le lien entre les changements de structure et le dérèglement de la fonction musculaire (Knoll et al., 2011). Il semble donc essentiel de mieux comprendre la fonction que pourrait exercer la O-GlcNAcylation au niveau de ce point nodal qu'est la strie Z.

4.3. Perspectives.

Il semble indispensable de mieux comprendre le lien étroit entre MLC2, phosphorylation et O-GlcNAcylation dans la modulation des propriétés d'activation calcique, notamment la sensibilité calcique. Dans un premier temps, l'existence d'un second site de

phosphorylation et/ou de O-GlcNAcylation sur la MLC2 doit être confirmée, de même que la localisation des sites modifiés. Il est également essentiel de caractériser de manière plus précise les fonctions exercées par la phosphorylation et la O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2, et leur impact sur la modulation des propriétés d'activation calcique. Nous pourrions ainsi envisager d'effectuer la déplétion des fibres musculaires pelées en MLC2 endogène (Patel et al., 1996), pour la remplacer par de la MLC2 phosphorylée ou de la MLC2 O-GlcNAcylée préalablement purifiées. Les paramètres d'activation calciques pourront alors être établis. Enfin, nous pourrions également envisager de déterminer si l'interaction entre la MLC2 et la myosine est dépendante de la O-GlcNAcylation, et si elle peut être modulée lors de la variation de O-GlcNAcylation, comme nous l'avons évoqué précédemment.

A ce jour, seules ont été effectuées des études sur fibres pelées, et sur les paramètres d'activation calcique. Cependant, il peut être envisagé de caractériser le rôle de la O-GlcNAcylation sur les propriétés mécaniques du muscle squelettique (force musculaire, tétanos...). En effet, il peut être envisagé d'augmenter ou de diminuer la O-GlcNAcylation chez la souris, et de mesurer l'activité contractile sur muscle entier. Etant donné le rôle de la phosphorylation de la MLC2 dans la potentialisation post-tétanique et son rôle dans la fatigue musculaire, il pourrait également être intéressant de caractériser l'effet de la O-GlcNAcylation vis-à-vis de la fatigue musculaire. De plus, concernant les différences en termes de phosphorylation et d'activités enzymatiques de la MLCK et de la MLCP entre les muscles lents et rapides, nous pourrions envisager de déterminer ces paramètres d'activation calciques sur des fibres rapides après augmentation du taux global de O-GlcNAcylation.

Enfin, concernant le complexe multienzymatique, il pourrait être envisagé de déterminer s'il existe des changements de localisation de ces enzymes lors de l'HH. Par ailleurs, l'organisation du complexe n'est pas encore définie. Il pourrait alors être possible d'identifier les partenaires protéiques directs ou indirects par spectrométrie de masse (Abu-Farha et al., 2008 ; Trakselis et al., 2005 ; Vasilescu et al., 2004).

CHAPITRE III

O-GlcNAcylation & homéostasie protéique

CHAPITRE III

O-GlcNAcylation & homéostasie protéique

Depuis de nombreuses années, l'une des thématiques du laboratoire est l'étude de la plasticité musculaire, notamment lors de l'atrophie fonctionnelle. De nombreux travaux se sont ainsi focalisés sur les changements phénotypiques et les modifications des propriétés contractiles, telles que les changements des propriétés d'activation calciques. Ce n'est que plus récemment que le laboratoire s'est intéressé à déterminer les mécanismes moléculaires et donc les voies de signalisation impliqués dans la plasticité musculaire et corticale. J'ai d'ailleurs participé à certaines de ces études depuis mon arrivée au laboratoire (Dupont et al., 2011 ; Mysoet et al., 2014).

Par ailleurs, lors de ma thèse, j'ai mis en évidence que la O-GlcNAcylation pouvait être impliquée dans le développement de l'atrophie musculaire (je présenterai ces travaux ci-après). Depuis mon recrutement au laboratoire, j'ai donc logiquement développé un projet de recherche permettant de lier atrophie musculaire (et par extension homéostasie protéique), O-GlcNAcylation et voies de signalisation cellulaires. J'ai eu l'opportunité d'initier pleinement ce projet de recherche grâce au soutien de l'ANR par le biais d'un financement ANR Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs (projet MYOSIGNAL, décision n°11JSV80060). Dans le cadre de ce projet a été recrutée Barbara DERACINOIS pour un stage post-doctoral, d'une durée de 18 mois. Aucun étudiant n'a été associé à ce projet.

Concernant cette thématique de recherche portant sur l'atrophie musculaire et les voies de signalisation cellulaires, j'ai également co-encadré avec le Pr Claudine FABRE (Université Lille 2) Samir BENSALD dans la cadre de son Master 2 Recherche à la faculté des Sciences du Sport et de l'Education Physique ; Samir a obtenu pour sa thèse un co-financement Université Lille 2 – Région Nord-Pas-de-Calais. Son projet de recherche porte sur la mise en place de contre-mesures (électro-stimulation, acides aminés, réoxygénation) afin de limiter l'atrophie induite par l'hypoxie. Je ne présenterai pas ces travaux dans ce mémoire.

1. La O-GlcNAcylation peut-elle être impliquée dans le développement de l'atrophie musculaire ?

Nous avons entrepris de déterminer si la O-GlcNAcylation pouvait être impliquée dans le développement de l'atrophie fonctionnelle du muscle squelettique. Notre étude a porté sur le soléaire (muscle lent) et l'EDL (*Extensor digitorum longus*, muscle rapide). Le soléaire est un muscle postural fortement touché par l'atrophie fonctionnelle induite par l'hypodynamie-hypokinésie (HH), alors que l'EDL n'est pas altéré. Notre étude a donc porté sur le soléaire et l'EDL, prélevés de rats soumis à 14 jours ou 28 jours d'HH. Différents

paramètres ont été mesurés : masse du muscle, taux global de O-GlcNAcylation, activité OGT, activité OGA, expression de ces deux enzymes de la O-GlcNAcylation, et enfin expression de HSP70. Concernant la variation de masse des muscle concernés, et comme nous pouvions nous y attendre, il y avait une diminution drastique de la masse du soléaire dès 14 jours, l'atrophie étant encore plus marquée après 28 jours de HH (perte de masse de 40% et de 59.6% respectivement). En revanche, la masse de l'EDL reste stable tout au long de l'HH.

1.1. Variation du taux global de O-GlcNAcylation et de phosphorylation.

Nous avons quantifié la variation du taux global de O-GlcNAcylation par marquage des protéines O-GlcNAcylées par du galactose tritié, et mesuré la radioactivité incorporée ; les résultats sont présentés figure 65.

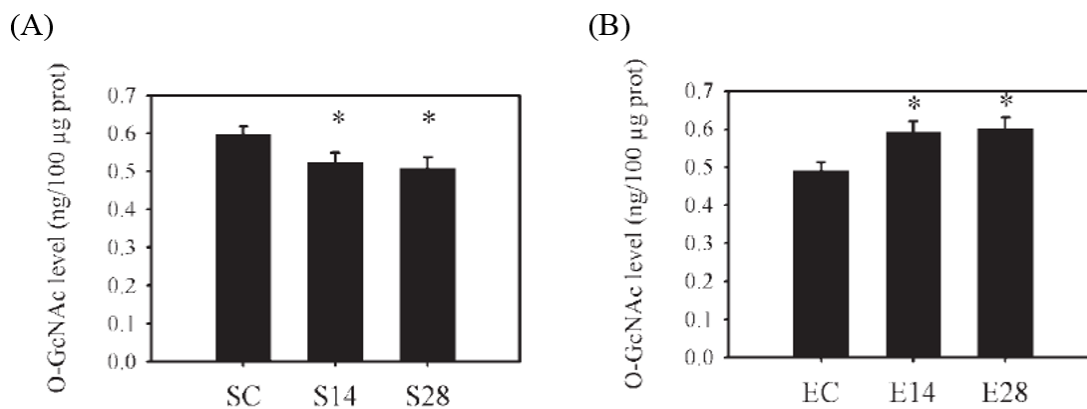


Figure 65 : Détermination de la variation du taux global de O-GlcNAcylation dans le soléaire et l'EDL consécutivement à l'HH. Le taux global de O-GlcNAcylation est déterminé après mesure de la radioactivité incorporée aux protéines O-GlcNAcylées suite au transfert de galactose tritié ; ce taux est exprimé en ng de GlcNAc pour 100 µg de protéines. Les mesures sont effectuées sur le soléaire (S) et l'EDL (E), dans des conditions contrôle (SC et EC), ou après 14 et 28 jours d'HH (S14 et S28 pour le soléaire ; E14 et E28 pour l'EDL). (modifié d'après Cieniewski-Bernard et al., 2006).

Nous avons déterminé que le taux global de O-GlcNAcylation est plus élevé dans le soléaire que dans l'EDL. Par ailleurs, après un épisode d'HH, nous avons mesuré une diminution significative du taux global de O-GlcNAcylation dans le soléaire dès 14 jours d'HH, ce taux restant stable lorsque l'HH se prolonge. De manière intéressante, des résultats contraires ont été obtenus pour l'EDL, avec une augmentation significative du taux de O-GlcNAcylation après 14 jours d'HH, ce taux restant ensuite stable pour des durées plus longues d'HH, comme nous l'avons observé pour le soléaire.

Etant donné qu'il existait, suite à l'HH, une modulation du taux global de O-GlcNAcylation dans le soléaire, mais aussi dans l'EDL, nous avons alors déterminé s'il y avait également une variation du taux global de phosphorylation. Après hydrolyse acide des groupements phosphates, nous avons mesuré la quantité d'ions phosphate après séparation par HPLC et détection par conductimétrie (figure 66A) ; ces données n'ont pas été publiées. Nous avons mis en évidence que bien que le taux global de O-GlcNAcylation était modulé consécutivement à l'HH, il n'y avait en revanche aucune variation du taux global de

phosphorylation dans le soléaire et dans l'EDL (figure 66B). Il est cependant intéressant de noter que le taux global de phosphorylation est sensiblement le même entre le muscle lent et le muscle rapide.

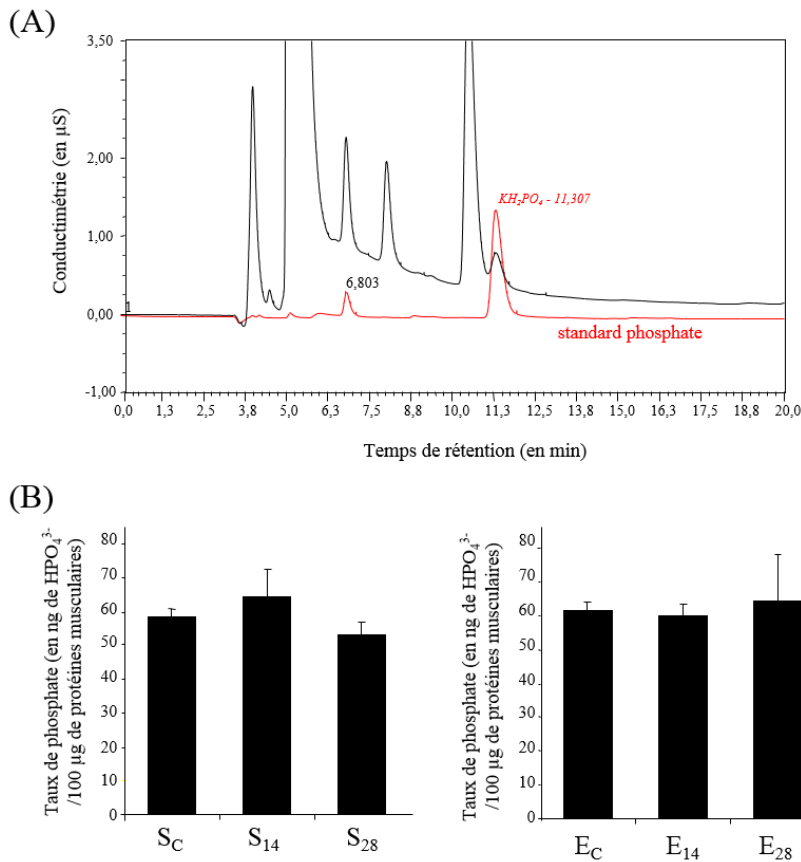


Figure 66 : Détermination de la variation du taux global de phosphorylation dans le soléaire et l'EDL consécutivement à l'HH. Le taux global de phosphorylation est déterminé par conductimétrie après libération des groupements phosphates des protéines et séparation par HPLC ; ce taux est exprimé en ng de phosphate de protéines. Les mesures sont effectuées sur le soléaire (S) et l'EDL (E), dans des conditions contrôle (SC et EC), ou après 14 et 28 jours d'HH (S14 et S28 pour le soléaire ; E14 et E28 pour l'EDL).

1.2. Variations d'expression et d'activités enzymatiques des enzymes de la O-GlcNAcylation.

De par la variation du taux global de O-GlcNAcylation, nous avons déterminé si l'expression (déterminée par mesure du taux d'ARNm) et/ou l'activité des enzymes de la O-GlcNAcylation étaient elles aussi modulées suite à l'HH. Comme nous pouvons l'observer figure 67, nous avons mesuré une diminution significative de l'activité de l'OGT dans le soléaire (figure 67A) tandis que l'activité OGA augmente significativement (figure 67D), ce qui est en accord avec la diminution du taux global de O-GlcNAcylation. Concernant l'EDL, nous avons mesuré une augmentation significative de l'activité de l'OGT, en corrélation avec l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation (figure 67D) ; cependant, de manière inattendue, nous avons également mesuré une augmentation de l'activité de l'OGA (figure 67E). Enfin, nous avons déterminé par PCR les changements d'expression de l'OGT et de l'OGA après 28 jours d'HH ; ni l'expression de l'OGT, ni celle de l'OGA, ne sont modifiées après HH (figure 67C et 67F, pour l'OGT et l'OGA respectivement). Il est à noter que l'activité OGT est plus élevée dans le soléaire que dans l'EDL, ce qui est en accord avec la différence de taux global de O-GlcNAcylation entre ces deux types de muscles. En revanche, l'activité OGA est sensiblement la même entre le muscle lent et le muscle rapide.

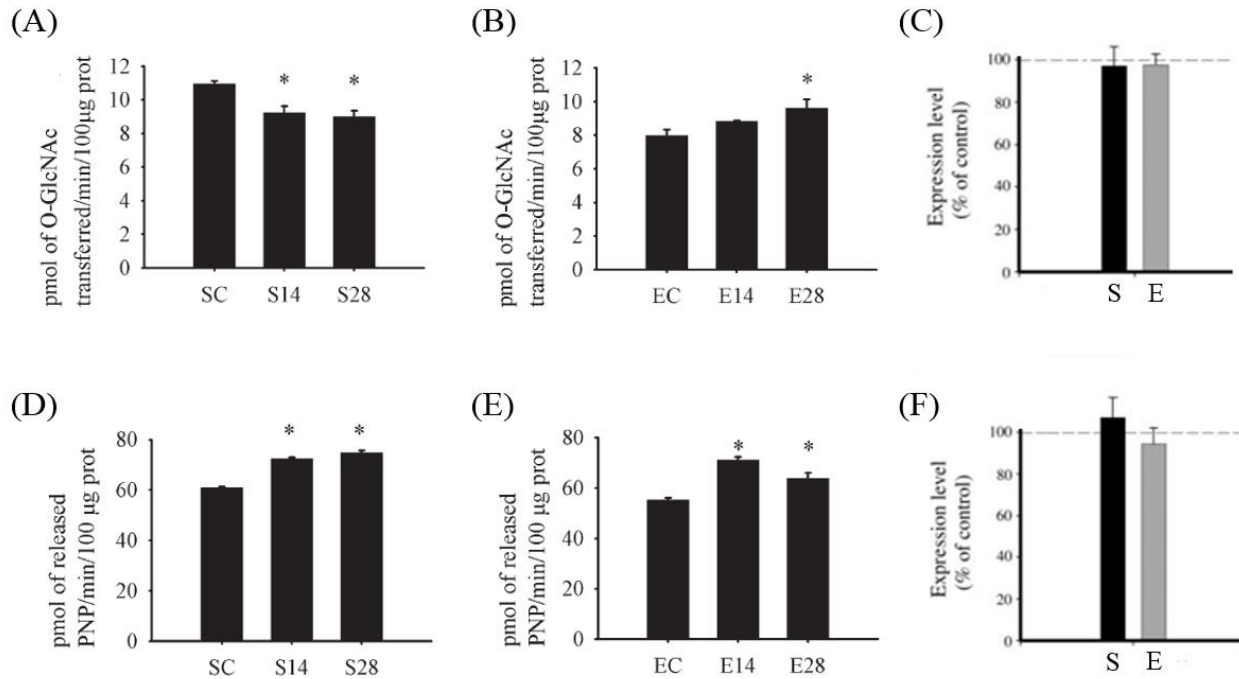


Figure 67 : Mesure de l'expression et de l'activité enzymatique de l'OGT et de l'OGA dans le soléaire et l'EDL après hypodynamie-hypokinésie. (A ; B) Mesure de l'activité de l'OGT, exprimée en pmol de GlcNAc transférée/min/100µg de protéines dans le soléaire (A) ou l'EDL (B) après 14 ou 28 jours d'HH. (C) Détermination de la variation d'expression (exprimée en % de variation par rapport au contrôle) de l'OGT dans le soléaire (S, en noir) et l'EDL (E, en gris) après 28 jours d'HH. (D ; E) Mesure de l'activité de l'OGA, exprimée en pmol de PNP libéré/min/100µg de protéines dans le soléaire (D) ou l'EDL (E). (F) Détermination de la variation d'expression (exprimée en % de variation par rapport au contrôle) de l'OGA dans le soléaire (S, en noir) et l'EDL (E, en gris) après 28 jours d'HH. (modifié d'après Cieniewski-Bernard et al., 2006)

Nous avons donc mis en évidence une corrélation entre les variations du taux global de O-GlcNAcylation et le développement de l'atrophie musculaire induite par l'HH. En effet, une diminution du taux global de O-GlcNAcylation accompagne la perte de masse du soléaire après HH, tandis que le taux global de O-GlcNAcylation augmente dans l'EDL, peu touché par l'atrophie. Cette diminution du taux de O-GlcNAcylation est observable après 14 jours d'HH et est maintenue après 28 jours d'HH. Ces variations du taux de O-GlcNAcylation ont été directement corrélées aux variations d'activité des deux enzymes du cycle glycosylation/déglycosylation, l'OGT et l'OGA, mais pas de leur expression. Notre hypothèse a donc été que l'augmentation de O-GlcNAcylation dans le muscle rapide EDL pourrait exercer un effet protecteur vis-à-vis de l'atrophie musculaire.

1.3. La O-GlcNAcylation protectrice vis-à-vis de l'atrophie fonctionnelle ?

De nombreux travaux ont montré que la diminution de la masse du muscle après une courte période d'HH, particulièrement bien marquée pour les muscles antigravitaires tels que le soléaire, s'accompagnait d'une diminution du contenu en protéines myofibrillaires (McDonald & Fitts, 1995). Cette atrophie est associée à une diminution de la concentration en protéines totales, liée à une augmentation du taux de dégradation et une diminution de la

synthèse protéiques (Edgerton & Roy, 1991 ; Goldspink et al., 1986 ; Steffen & Musacchia, 1985 ; Thomason et al., 1989 ; Thomason & Booth, 1990). Lors de l'atrophie musculaire, on note une augmentation de la transcription d'éléments du système ubiquitine-protéasome, ainsi qu'une activation de ce système (Bodine et al., 2001 ; Price, 2003). Il a par ailleurs été démontré que des inhibiteurs du protéasome, tels que le MG132, réduisaient le phénomène de protéolyse observé lors de l'atrophie des muscles squelettiques (Tawa et al., 1997).

Il a été démontré que le protéasome lui-même est régulé par l'intermédiaire de la O-GlcNAcylation, cette modification post-traductionnelle l'inhibant de manière réversible (Zhang et al., 2003). Par ailleurs, la O-GlcNAcylation protégerait également certaines protéines vis-à-vis de la dégradation protéasomale (Cheng et al., 2000 ; Han & Kudlow, 1997 ; Hatsell et al., 2003). Il a également été démontré que le taux de O-GlcNAcylation augmente rapidement dans des cellules en culture soumises à différentes formes de stress tels que le choc thermique, le stress éthylique, les ultra-violets, l'hypoxie, ainsi que les stress oxydatif, réducteur et osmotique (Zachara et al., 2004b ; Zachara & Hart, 2004). Le fait de « bloquer » la O-GlcNAcylation, ou d'en diminuer le taux, augmente la sensibilité des cellules au stress, provoquant une diminution de la survie de ces cellules. Au contraire une augmentation du taux de O-GlcNAcylation protège les cellules vis-à-vis des différentes formes de stress. Le mécanisme par lequel la O-GlcNAcylation protégerait la cellule contre les différentes formes de stress impliquerait les protéines de choc thermique HSP70 et HSP40 (Zachara et al., 2004b). HSP70, localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules eucaryotes, est impliquée dans la protection et la remise en conformation de protéines dénaturées évitant ainsi leur agrégation ; or, cette protéine de choc thermique de 70 kDa possède une activité lectinique vis-à-vis du motif O-GlcNAc (Guinez et al., 2004). Ces données impliquent que l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation des protéines lors d'un stress cellulaire permettrait une reconnaissance des protéines ainsi modifiées par des protéines de choc thermique, ce qui éviterait leur dénaturation ou leur agrégation, limitant ainsi les effets délétères pour la cellule.

Le stress oxydatif semble également jouer un rôle important dans le phénomène d'atrophie musculaire (Powers et al., 2005), les protéines oxydées étant plus sensibles aux attaques protéolytiques. Ainsi, l'HH augmente le stress oxydatif en déséquilibrant le système anti-oxydant de la cellule musculaire (Lawler et al., 2003). Un rôle d'HSP70 dans le processus d'atrophie musculaire a également été considéré. En effet, l'atrophie est atténuée lorsque les animaux sont soumis à un choc thermique avant l'HH (Naito et al., 2000). Or, dans l'EDL, nous avons quantifié une augmentation significative de l'expression d'HSP70, alors qu'au contraire, le taux d'HSP70 semblait présenter une tendance à la diminution dans le soléaire (figure 68). Il est donc concevable de supposer qu'une augmentation du taux de O-GlcNAcylation concomitante à l'augmentation du taux de HSP70 pourrait prévenir de la dégradation des protéines par le protéasome, et donc limiter le développement de l'atrophie dans l'EDL.

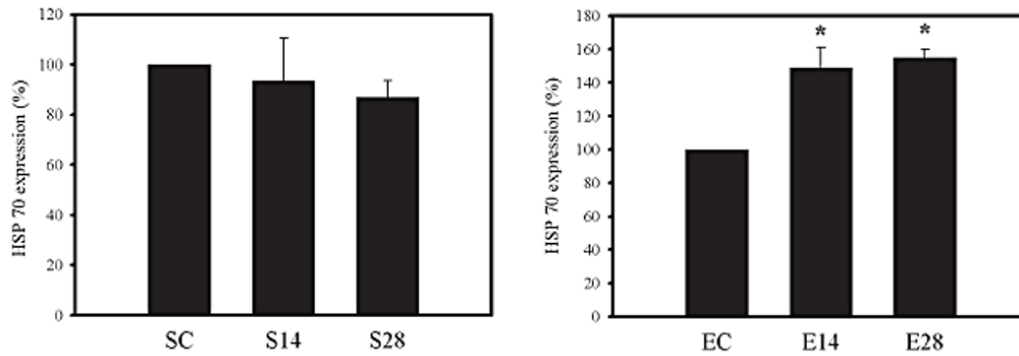


Figure 68 : Variation d'expression de la protéine de choc thermique HSP70. La variation d'expression d'HSP70 a été déterminée par western blot à partir d'extraits de soléaire ou d'EDL, après un épisode de 14 (S14 et E14) ou 28 jours (S28 et E28) d'HH, et comparés par rapport aux muscles témoins (SC et EC). (d'après Cieniewski-Bernard et al., 2006).

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que les variations du taux de O-GlcNAcylation pourraient être associées au développement de l'atrophie musculaire et que la O-GlcNAcylation pourrait protéger les protéines contre la dégradation protéasomale. Ainsi, une diminution du taux de O-GlcNAcylation associée à une augmentation du stress oxydatif pourrait induire le développement de l'atrophie musculaire observé après HH, tandis qu'une augmentation du taux de O-GlcNAcylation, corrélée aux variations d'expression de la protéine de choc thermique HSP70, pourrait au contraire protéger les protéines glycosylées contre la dégradation, et donc prévenir le muscle de l'atrophie. Ces travaux associent donc O-GlcNAcylation et atrophie musculaire, et suggèrent que la O-GlcNAcylation pourrait être liée au contrôle de l'homéostasie des protéines musculaires.

2. O-GlcNAcylation & voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le développement de l'atrophie.

2.1. Revue de littérature.

2.1.1. Atrophie, hypertrophie et signaux intracellulaires.

L'atrophie musculaire, outre la perte drastique de masse, conduit à terme à une altération de la fonction motrice. Quelle que soit son origine (maladies neuromusculaires, inactivité, vieillissement, lésions de la moelle épinière, cancer, SIDA, diabète...) (Egerman & Glass, 2014), l'atrophie est un syndrome pour lequel les traitements ou contremesures sont sans efficacité réelle aujourd'hui, excepté certains protocoles d'exercice qui ont des effets bénéfiques mais spécifiques de certains types de fibres musculaires uniquement. Ainsi, une meilleure compréhension des processus moléculaires intracellulaires impliqués dans le développement de l'atrophie musculaire pourrait favoriser l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques, afin de limiter voire contrecarrer la perte de masse, et donc *in fine* la perte de fonction, et ainsi favoriser une meilleure qualité de vie des patients.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la masse musculaire impliquent une multitude de voies de signalisation intracellulaires, variées mais complémentaires, et étroitement interconnectées (Bonaldo & Sandri, 2013 ; Lynch et al., 2007), constituant un réseau extrêmement complexe. Celui-ci permet de contrôler et de coordonner les signaux atrophiques et les signaux hypertrophiques. Dans des conditions physiologiques normales, l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéiques (homéostasie protéique) est conservé, et la masse musculaire reste stable. En revanche, la perte de cet équilibre conduira soit à une perte de masse (atrophie), soit à un gain de masse (hypertrophie) (Egerman & Glass, 2014).

L'atrophie et l'hypertrophie sont deux réponses antagonistes fortement régulées. Se produisant dans le muscle « malade », l'atrophie correspond à une perte dramatique de masse musculaire et une diminution du diamètre des fibres musculaires qui vont être en partie responsable d'une perte de force (Fluck & Hoppeler, 2003). Au contraire, la masse musculaire, le diamètre des fibres et la force augmentent, conduisant à l'hypertrophie dans des situations variées telles que l'exercice, l'électrostimulation ou la supplémentation en nutriments, tels que les acides aminés branchés (Boonyarom & Inui, 2006). Le schéma global des interactions entre ces réseaux intracellulaires complexes conduisant à l'atrophie musculaire est encore mal compris dans sa globalité. Néanmoins, il est largement admis que l'équilibre protéique, ou homéostasie protéique, résulte d'une combinaison entre la synthèse protéique et la dégradation protéique, et non de la modulation indépendante de ces deux mécanismes. De nombreuses voies de signalisation intracellulaires ont été démontrées comme impliquées dans le turn-over protéique, en particulier l'axe GH/IGF-1 (Growth Hormone/Insulin-like Growth Factor 1), les nutriments, les glucocorticoïdes, la myostatine, les cytokines, ou encore des stimuli β -adrénergiques (figure 69) (Bassel-Duby & Olson, 2006 ; Cassano et al., 2009 ; Glass, 2005 ; Kandarian & Jackman, 2006 ; Sandri, 2008). Ces données suggèrent que la physiopathologie de l'atrophie du muscle squelettique est extrêmement complexe ; les voies intracellulaires impliquées dans la synthèse protéique sont déficientes tandis que celles conduisant à la dégradation protéiques sont activées.

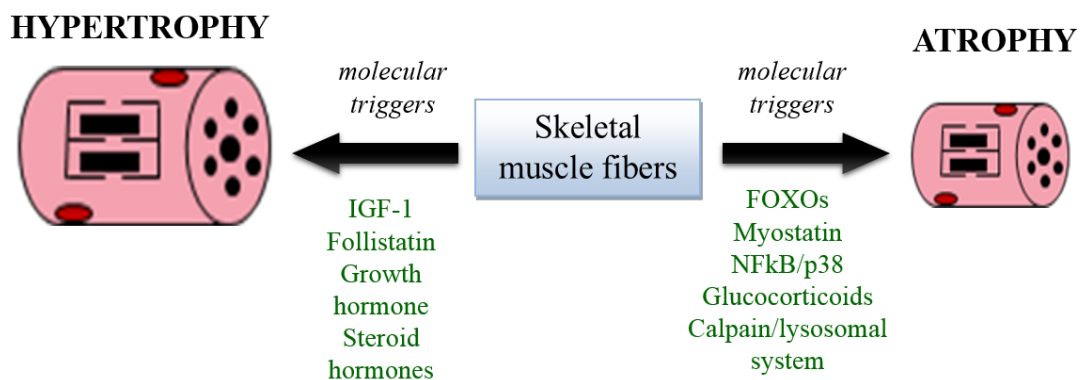


Figure 69 : Éléments moléculaires clés impliqués dans la plasticité musculaire (atrophie ou hypertrophie du muscle squelettique). (d'après Cassano et al., 2009).

2.1.2. L'axe IGF-1/PI3K/Akt/mTOR.

Parmi les régulateurs positifs de la masse musculaire, l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) est probablement le facteur promoteur de la masse musculaire le mieux caractérisé dans l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR (Clemmons, 2009 ; Glass, 2005). L'activation spécifique du récepteur de l'IGF-1 et ses effecteurs en aval sont représentés schématiquement en figure 70.

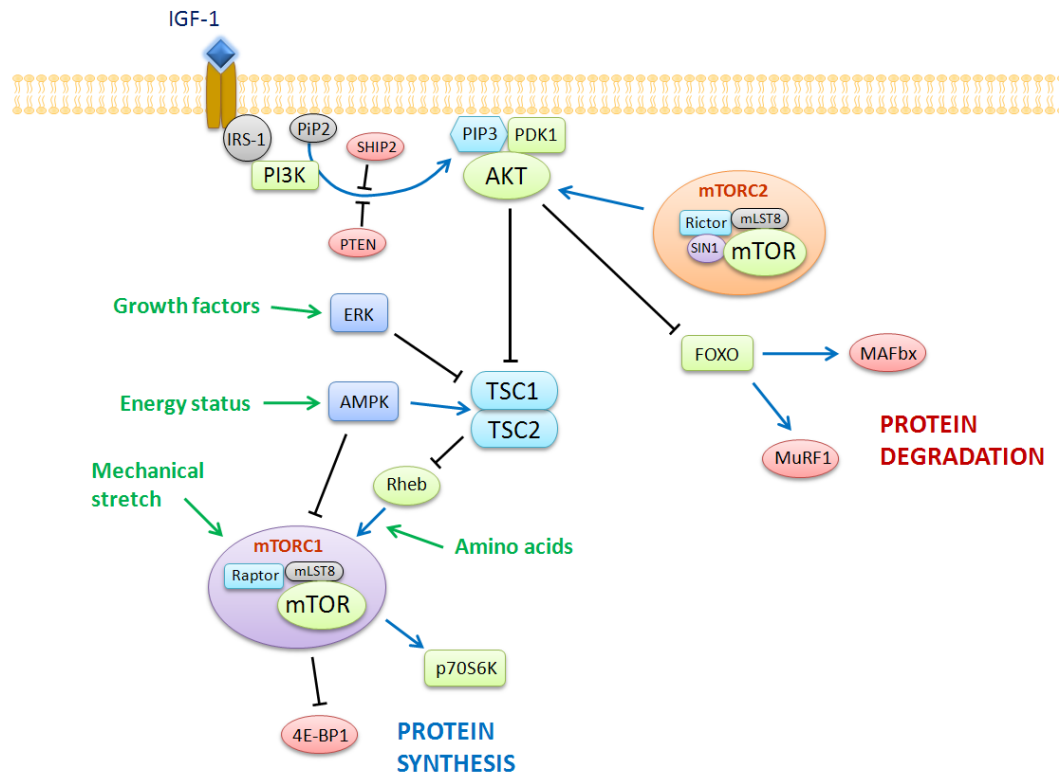


Figure 70 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, dépendante de l'IGF-1, impliquée dans la régulation de la masse musculaire. Comme on peut le voir sur ce schéma, l'activation de la voie par le récepteur de l'IGF-1 régule la synthèse protéique via mTOR, ainsi que la dégradation protéique via FoxO. Notez le rôle central d'Akt et du complexe TSC1-TSC2. En vert sont représentés certains signaux modulant la voie de signalisation par l'intermédiaire de kinases spécifiques (modifié d'après Huang & Manning, 2009).

L'IGF-1 active son récepteur spécifique, portant une activité kinase intrinsèque, suivi par le recrutement de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) puis par la synthèse du PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), un second messager de nature lipidique crucial. La génération du PIP3 permet le recrutement à la membrane de plusieurs protéines dont PDK-1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase-1) et Akt, conduisant ainsi à l'activation de cette dernière. La réaction opposée implique des activités de 5'-phosphatase par l'intermédiaire de PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) et SHIP2 (SH2 Domain-containing Inositol Phosphatase 2). En aval de l'activation du récepteur à l'IGF-1, Akt joue un rôle central par la phosphorylation d'un large spectre de protéines telles que mTOR, FoxO (Forkhead box O), NFκB (Nuclear Factor Kappa Beta), Bad ou GSK3β (Glycogen Synthase Kinase-3 Beta). De par l'activation/désactivation de ces protéines, Akt est étroitement lié au turn-over protéique,

à la croissance cellulaire, la survie cellulaire, ou le métabolisme glucidique (Ooms et al., 2009). Le rôle clé de Akt dans la synthèse protéique est lié au complexe TSC1-TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex Gene 1 - Tuberous Sclerosis Complex Gene 2) et à mTOR (voir ci-dessous), tandis de la régulation de la dégradation protéique implique les protéines FoxO (voir le paragraphe 2.1.4. « Atrophie du muscle squelettique et processus de dégradation »).

2.1.3. Une dynamique complexe entre Akt, TSC2 et les complexes mTOR.

Le régulateur central de la synthèse protéique est la protéine mTOR (Miyazaki & Esser, 2009). La régulation de la synthèse protéique est effectuée plus spécifiquement par le complexe mTORC1 (mTOR Complex 1), incluant mTOR, Raptor et mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 protein 8). Une fois activé, mTORC1 stimule la synthèse protéique *via* l'activation des S6 kinases (S6K1 et S6K2) et l'inhibition de 4E-BP1 (Eucaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1) (figure 70). L'activité mTORC1 est inhibée par le complexe TSC1-TSC2 par l'intermédiaire de Rheb (Huang & Manning, 2009). En fait, Akt active indirectement mTOR par l'inhibition de TSC2. Par ailleurs, mTOR fait également partie d'un autre complexe, le complexe mTORC2 (mTOR Complex 2) constitué par mTOR, Rictor, SIN1 (Stress-activated-protein-kinase-Interacting protein 1) et mLST8. La seule cible directe de mTORC2 est Akt, contribuant ainsi à la pleine activation de Akt (Huang & Manning, 2008).

La voie PI3K/Akt n'est pas l'unique voie intracellulaire conduisant à l'activation de mTOR. Ainsi, le complexe TSC1-TSC2 a émergé en tant que point central, une sorte de « carrefour » vers lequel vont converger différentes informations issues de processus cellulaires distincts. En effet, l'activité du complexe TSC1-TSC2 est modulée par un large spectre de kinases, associant étroitement le complexe TSC1-TSC2 aux voies de signalisation dépendante des facteurs de croissance et des acides aminés, à la signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou encore à la voie dépendante de l'AMPK (AMP-Activated Protein Kinase), et donc du pool énergétique de la cellule, parmi d'autres (Huang & Manning, 2008). En outre, l'implication du complexe TSC1-TSC2 est aujourd'hui bien documentée dans le processus de cancérisation, de maladies neurodégénératives, dans l'hypertrophie cardiaque ou la résistance à l'insuline (Hafen, 2004 ; Mieulet & Lamb, 2010 ; Rosner et al., 2008) ; des souris transgéniques surexprimant le gène *TSC1* présentent une atrophie musculaire (Wan et al., 2006).

2.1.4. Atrophie musculaire et processus de dégradation.

La diminution de la synthèse protéique n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le développement de l'atrophie musculaire. En réalité, l'atrophie résulte également d'une augmentation du(des) processus de dégradation des protéines, conduisant ainsi à une diminution du contenu protéique de la cellule. Plusieurs processus de dégradation sont impliqués dans la protéolyse excessive impliquée dans l'atrophie musculaire : le lysosome, les calpaïnes, et la dégradation protéasomale (Jackman & Kandarian, 2004). En particulier, l'augmentation de la protéolyse est en grande partie liée au processus d'ubiquitine-protéasome

après l'induction des E3 ubiquitine ligases, conférant la spécificité du substrat à dégrader. Parmi toutes les E3 ubiquitine ligases, deux marqueurs de l'atrophie ont été identifiés : MuRF-1 (Muscle Ring Finger 1) et MAFbx (Muscle Atrophy F-box), également appelée atrogin-1 (Bodine et al., 2001). Ces E3 ubiquitine ligases sont surexprimées dans de multiples modèles d'atrophie : dénervation, immobilisation, traitement par des glucocorticoïdes, septicémie, et bien d'autres encore (Glass, 2005). En particulier, l'ubiquitination des protéines myofibrillaires, dépendante de MuRF-1, conduit à la dégradation des myofilaments lors de l'atrophie musculaire (Centner et al., 2001 ; Cohen et al., 2009 ; Kedar et al., 2004) ; MAFbx transfère les résidus d'ubiquitine au niveau de protéines préalablement phosphorylées en réponse à des signaux atrophiques (Jackson & Eldridge, 2002 ; Li et al., 2004 ; Tintignac et al., 2005). La surexpression de ces E3 ubiquitine ligases implique la famille des facteurs de transcription FoxO, qui agissent directement en aval d'Akt (Sandri et al., 2004 ; Stitt et al., 2004) (figure 70). Dans des myotubes en culture, Marco Sandri et ses collaborateurs ont montré que le facteur de transcription FoxO est exclus du noyau lorsqu'il est phosphorylé par Akt, alors qu'il entre dans le noyau à l'état déphosphorylé (Sandri et al., 2004).

2.2. Objectifs du projet MYOSIGNAL.

Comme nous venons de le voir, l'atrophie musculaire, correspondant à une diminution drastique de la masse du muscle squelettique, résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéiques. Ce déséquilibre est lié à des processus d'activation/désactivation de voies de signalisation intracellulaires. Au vu des nombreuses données bibliographiques, en plein essor aujourd'hui, l'étude des voies de signalisation impliquées dans le processus d'atrophie est un réel challenge aujourd'hui. Cependant, l'ensemble de ces données concernant l'altération des voies de signalisation intracellulaires lors de l'atrophie musculaire ne considèrent que la dérégulation de la phosphorylation, les voies de transduction des signaux étant en majeure partie régulées par la phosphorylation. Cependant, bien que certains facteurs aient été identifiés comme modifiés par la O-N-acétylglucosaminylation, l'implication de cette glycosylation n'avait pas été considérée jusqu'alors dans la régulation de la synthèse protéique. L'objectif principal de notre projet a donc été de caractériser le rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la synthèse protéique du muscle squelettique. Nous nous sommes plus spécifiquement focalisés sur la voie de signalisation dépendante de l'IGF1.

Approche scientifique et technique. L'ensemble des travaux a été effectué sur des cellules musculaires murine en culture de type C2C12, différenciées en myotubes. Les myoblastes sont ensemencés dans les boîtes de culture pour proliférer, puis lorsque les cellules sont proches de la confluence, les cellules seront différenciées en myotubes : les myoblastes vont fusionner pour aboutir à des cellules fusiformes plurinucléées appelées myotubes (figure 71). Lorsque le projet a été initié au laboratoire, nous débutions à peine la culture cellulaire. Il a donc été nécessaire d'optimiser les conditions optimales de culture, d'extractions, mais également les protocoles de mesure de la viabilité cellulaire ainsi que de marquage. Nous avons également déterminé le stade optimal de différenciation des myotubes pour l'application des différents

traitements (ici les traitements à l'IGF-1 et/ou au Thiamet G, ainsi que la période de sevrage précédant l'application des traitements).

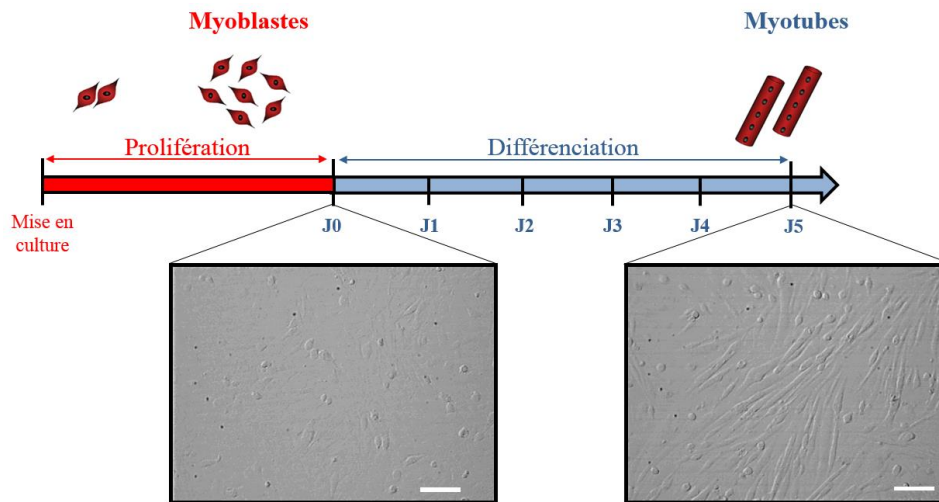


Figure 71 : Culture de cellules musculaires de type C2C12. Notez le stade de prolifération des myoblastes, mononucléés, et le stade de différenciation aboutissant à des cellules musculaires fusiformes et plurinucléées : les myotubes. Tous les traitements ont été appliqués sur des myotubes matures, après 5 jours de différenciation.

Ainsi, après un sevrage de 4 heures, les cellules ont été traitées par de l'IGF-1 (activateur de la synthèse protéique) et/ou par le Thiamet G, inhibiteur de l'OGA (le taux global de O-GlcNAcylation est donc augmenté). Les myotubes matures de type C2C12 ont ainsi été traités : (i) par l'IGF-1, à des concentrations de 10 et 50 ng/ml, pendant 30 min ou 2h ; (ii) par le Thiamet G à une concentration de 0.5 μ M, pendant des durées équivalentes aux traitements par l'IGF-1 ; (iii) par un co-traitement IGF-1 + Thiamet G, aux concentrations et aux durées de traitement définies précédemment. Dans certaines conditions expérimentales, un pré-traitement au Thiamet G a été appliqué aux myotubes pendant la période de sevrage précédant le traitement par l'IGF-1, et ce pour une durée de 4 heures, les traitements étant les mêmes que ceux décrits précédemment.

2.3. Effet de l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur la synthèse protéique.

2.3.1. Identification des protéines de la voie de l'IGF-1 modifiées par la O-GlcNAcylation.

Nous avons tout d'abord identifié les protéines de la voie de signalisation dépendante de l'IGF-1 modifiées par la O-GlcNAcylation, après immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées et détection des protéines d'intérêt par western blot. Les résultats sont présentés figure 72. Nous avons ainsi déterminé qu'un grand nombre de protéines était modifié par cette glycosylation, notamment des protéines impliquées dans la voie de synthèse protéique, dans l'inhibition/inactivation de cette voie, ainsi que des protéines impliquées dans la dégradation

protéique. Cependant, pour certaines protéines, nous n'avons pu conclure précisément quant à leur nature O-GlcNAcylée ; il s'agit en particulier de PTEN, PHLPP, FoxO3A et MAFbx.

Protein	Immuno blot				O-GlcNAc modification
	TE	IP ctrl	IP 1mg	IP 2.5mg	
IGF-1R					YES
PI3K					YES
SHIP2					YES
PTEN	No signal				?
PP2A-A					NO
PP2A-B					YES
CTMP					NO
PHLPP	No signal				?
Akt					YES
Hamartin (TSC1)					YES
Tuberin (TSC2)					YES

Protein	Immuno blot				O-GlcNAc modification
	TE	IP ctrl	IP 1mg	IP 2.5mg	
PRAS40					NO
mTOR					YES
4EBP1					YES
P70S6K					YES
Fox O1					YES
FoxO3A	No signal				?
FoxO4					NO
MURF1					NO
Atrogin-1 (MAFBX)	No signal				?
OGT					YES
OGA (MGEA9)					YES

Figure 72 : Identification des protéines de la voie de signalisation dépendante de l'IGF-1 modifiées par la O-GlcNAcylation. Les protéines O-GlcNAcylées ont été immunoprécipitées à partir d'un extrait protéique de 1 ou 2.5 mg, et les signaux sont comparés par rapport à un extrait total (TE). Un témoin négatif a également été effectué (IP ctrl), dans lequel le même protocole expérimental a été effectué, mais en ayant omis l'anticorps RL-2.

Fait intéressant, il semblerait que pour certaines protéines (en particulier TSC2), la localisation subcellulaire (cytosol ou membrane cellulaire) soit dépendante de l'état de glycosylation (figure 73).

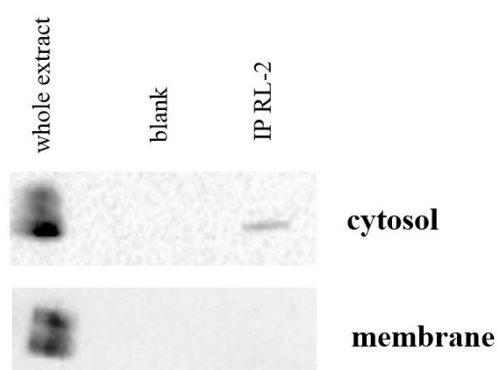


Figure 73 : O-GlcNAcylation de TSC2 selon sa localisation subcellulaire. Les protéines O-GlcNAcylées ont été immunoprécipitées à partir d'une fraction enrichie en cytosol et d'une fraction enrichie en membrane. La protéine TSC2 est détectée par western blot.

2.3.2. Analyse des effets du Thiamet G sur la voie de signalisation dépendante de l'IGF1.

Dans le cadre de ce contrat ANR, nous avons fait l'acquisition d'un imageur (Chemidoc MP, Biorad), permettant la réalisation de western blot sur la base de la technologie « Stain-free ». Cette « chimie en gel » est basée sur l'incorporation dans le gel d'un composant « trihalo » qui, lorsqu'il est exposé à une irradiation UV, active la formation d'une liaison covalente entre ce composé trihalo et les résidus de tryptophane des protéines séparées durant la migration électrophorétique. Cette approche offre un réel avantage pour la quantification par western blot puisqu'il n'est plus nécessaire de normaliser par la détection d'une protéine domestique, source d'un biais pour la normalisation (Short & Posch, 2011). Nous avons dû optimiser les conditions de migration, d'activation et de transfert semi-sec de

ces gels, ainsi que les conditions de détection et d'analyse des signaux. Toutes les données présentées ci-après ont été analysées selon cette méthodologie.

Nous avons donc analysé l'effet d'une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur l'état d'activation (ou d'inhibition par exemple pour des protéines telles que 4EBP1) des protéines clés de la voie de l'IGF-1, et ce à différentes concentrations d'IGF-1 et différentes durées de traitement. L'état d'activation (ou d'inhibition) de nombreuses protéines de la voie de signalisation de l'IGF-1 ont ainsi été analysées par western blot (protéines énumérées dans la figure 72). Je ne présenterai ici que les résultats pour des protéines clés de la voie de l'IGF-1, ayant présenté des variations significatives de leur état de phosphorylation ou d'expression (figure 74).

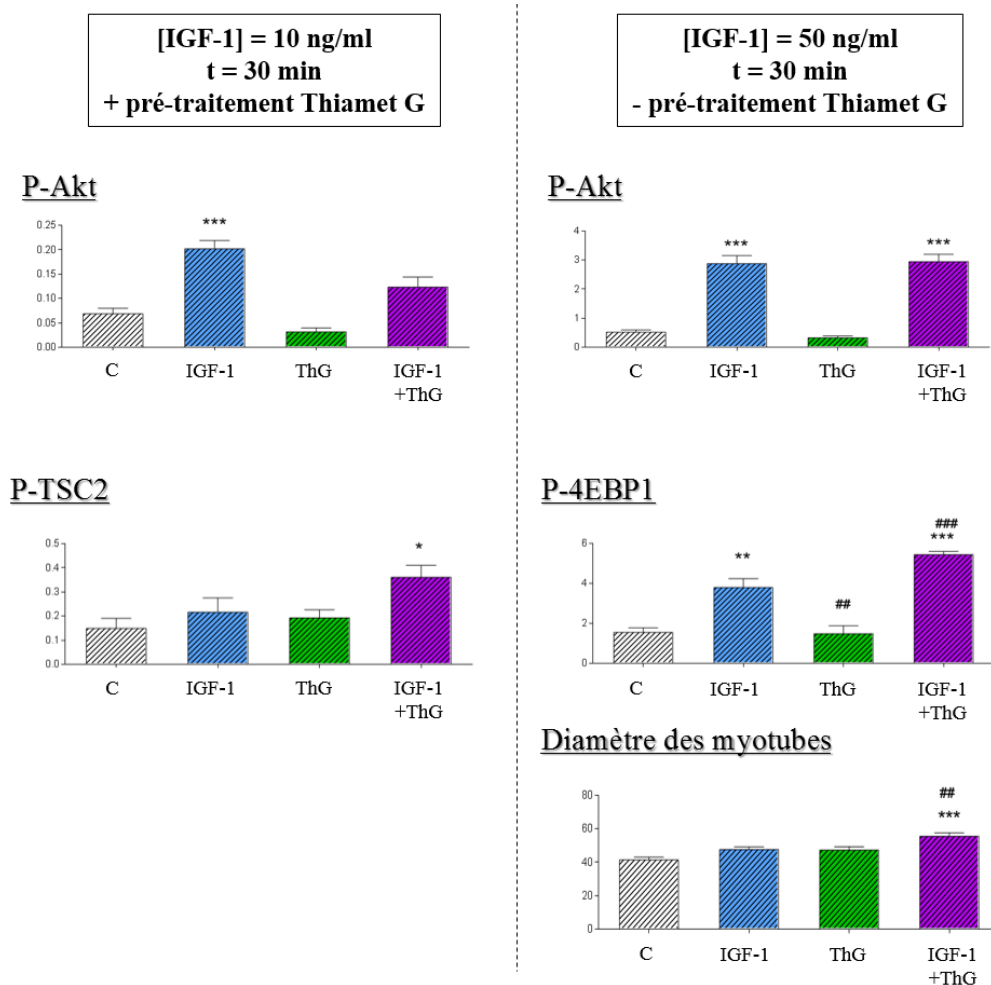


Figure 74 : Etat d'activation de la protéine Akt ($^{473}\text{P-Akt}$) lors de la stimulation de myotubes C2C12 par l'IGF-1, ainsi que de P-TSC2 et de P-4EBP1 ; le diamètre des myotubes a également été mesuré. Les cellules sont traitées par 10 ou 50 ng/ml d'IGF-1 pendant 30 min, et/ou par 0.5 μM de Thiamet G (ThG) ; les cellules sont traitées ou non par le Thiamet G pendant la période de sevrage.

Nous avons donc mis en évidence, lorsque le taux de O-GlcNAcylation était augmenté, que (i) le taux d'activation basal de certaines protéines (notamment Akt) était diminué, notamment lorsque les cellules ont été traitées avec le Thiamet G pendant la période

de sevrage, (ii) le **taux d'activation consécutif au traitement par l'IGF-1 de protéines clés telles que Akt était réduit**, et (iii) **qu'à dose élevée d'IGF-1, l'effet inhibiteur de la O-GlcNAcylation s'amenuisait**. L'ensemble de ces données suggère donc un **effet inhibiteur et compétitif de la O-GlcNAcylation, mais ce uniquement à de faibles concentrations d'IGF-1**. De plus, nos résultats suggèrent qu'au contraire, à des concentrations élevées d'IGF-1, il y ait une **potentialisation de l'état de phosphorylation (donc d'inhibition) de la protéine 4EBP1, protéine clé dans la promotion de la synthèse protéique**, ce qui est également confirmé par l'augmentation du diamètre des myotubes. Enfin, nous avons mesuré une augmentation de la phosphorylation de TSC2, suggérant que l'effet de Thiamet G implique d'**autres voies de signalisation convergeant vers TSC2 pour la modulation de la synthèse protéique**.

2.3.3. Analyse des effets du Thiamet G sur la synthèse protéique.

Comme nous venons de le voir, l'ensemble de ces résultats semblent indiquer que les effets de la O-GlcNAcylation sont très complexes et seraient dépendants notamment du niveau d'activation de la voie IGF-1. Afin de mieux comprendre ces mécanismes spécifiques et donc l'impact réel de la O-GlcNAcylation, nous avons entrepris de mesurer précisément la néosynthèse protéique. Cette approche expérimentale, basée sur la Click Chemistry, permet un marquage spécifique par immunofluorescence des protéines nouvellement synthétisées par l'incorporation de la L-azidohomoalanine, et donc leur quantification après leur séparation par SDS-PAGE.

L'AHA (L-azidohomoalanine) est un acide aminé analogue à la méthionine contenant une fonction azide. Cet acide aminé non naturel est additionné au milieu de culture afin d'être incorporé au niveau des protéines lors de la synthèse protéique. La détection est basée sur la Click chemistry, avec la ligation spécifique d'un fluorophore-alkyne (figure 75A) ou de biotine-alkyne. Les protéines néosynthétisées pourront donc être détectées de manière sensible par fluorescence en gels 1D ou par western blot ; cette approche est compatible avec une analyse en aval par spectrométrie de masse (LC-MS/MS ou MALDI-MS). La détection des protéines néosynthétisées peut également être envisagée par immunofluorescence, après marquage des protéines ayant incorporé l'AHA par un fluorophore (figure 75B). Nous avons ainsi pu observer une synthèse préférentielle des protéines myofilamentaires, puisqu'on visualisait un co-marquage entre les chaînes lourdes de myosine (en rouge sur la figure 75B) et les protéines néosynthétisées (en vert sur la figure 75B).

Nous avons entrepris de mesurer la néosynthèse protéique consécutivement aux différents traitements appliqués sur les myotubes, afin de pouvoir conclure quant au rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la synthèse protéique. Cette analyse est encore en cours au laboratoire ; néanmoins, des résultats préliminaires (figure 75C) semblent nous indiquer que lors du co-traitement IGF-1 + Thiamet G, il y a une tendance à l'augmentation de la néosynthèse protéique comparativement au traitement IGF-1 seul. Cependant, ces résultats n'ont été obtenus qu'à partir d'une seule culture de myotubes C2C12, et doivent par conséquent être confirmés et validés sur un nombre plus conséquents d'échantillons.

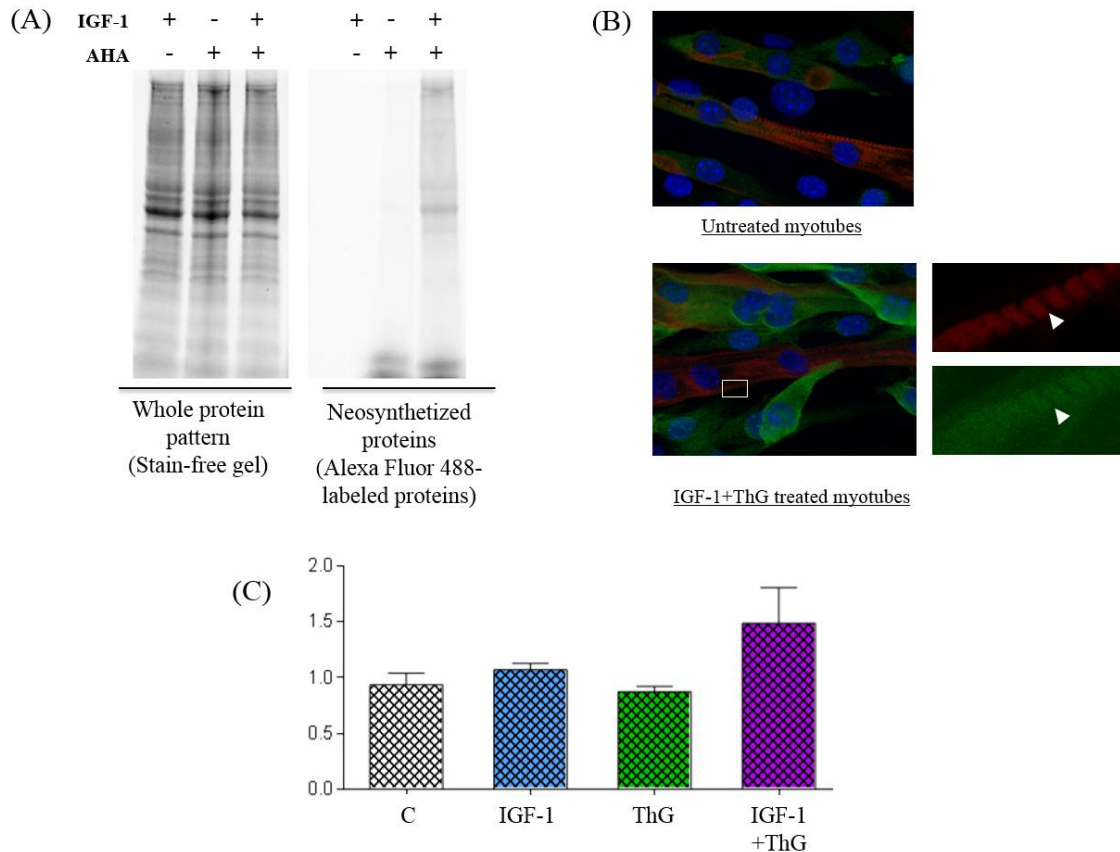


Figure 75 : Marquage des protéines néosynthétisées par la Click chemistry. Des myotubes C2C12 sont traités ou non par l'IGF-1, et en présence ou non de L-azidohomoalanine (AHA). Les protéines néosynthétisées sont ensuite détectées par détection de la fluorescence après séparation électrophorétique (A), ou après marquage des myotubes par immunofluorescence (B). Notez la superposition des signaux entre les protéines néosynthétisées (en vert) et le marquage des chaînes lourdes de myosine (en rouge) (encart en (B)). (C) Mesure de la néosynthèse protéique à partir de myotubes C2C12 traités par l'IGF-1 +/- Thiamet G (résultats préliminaires).

3. Développement d'une méthodologie de mesure d'activités kinases et OGT par spectrométrie de masse.

Les travaux que je vais présenter dans ce paragraphe auraient pu être inclus dans le chapitre « O-GlcNAcylation, protéomique et développements méthodologiques ». J'ai cependant fait le choix de présenter ici ces travaux, puisque j'ai entrepris de développer cette méthode spécifiquement pour pouvoir analyser les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la plasticité du muscle squelettique (notamment modification de la masse musculaire). En effet, l'analyse de l'état de phosphorylation (et/ou de O-GlcNAcylation) de protéines d'intérêt selon le protocole « classique » a nécessité une approche méthodologique assez lourde à mettre en œuvre lorsqu'on souhaite analyser un nombre important de protéine, et résulte en un travail fastidieux, chronophage, et à un coût assez élevé (gels, membranes, anticorps...). De plus, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.1.1 de ce chapitre (« Atrophie, hypertrophie et signaux intracellulaires »), la modulation de la masse musculaire résulte de l'interaction concomitante de multiples voies de signalisation intracellulaires, sous

la dépendance de différents facteurs de croissance (IGF-1, myostatine), des glucocorticoïdes, de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6), ou encore de stimuli de stress (Fanzani et al., 2012).

J'ai donc entrepris de mettre en place au laboratoire une méthodologie basée sur la mesure d'activités enzymatiques par spectrométrie de masse. Afin de mettre en place ce projet, j'ai bénéficié du soutien financier de l'AFM-Téléthon, dans le cadre d'un appel d'offre en 2013 « Projet Tremplin » (projet HIGHPEP-PATH, contrat AFM 16986).

3.1. Revue de littérature : analyse de l'état d'activation des voies de signalisation intracellulaires.

La méthode la plus couramment utilisée pour l'étude de l'état d'activation des voies de signalisation intracellulaires est l'analyse par western blot, plus spécifiquement une semi-quantification du niveau de phosphorylation des protéines clé de la signalisation. Tandis que cette analyse par western blot reste prédominante pour la semi-quantification, différentes méthodes ont été développées afin de permettre la quantification exacte de l'activité de kinases. Généralement basées selon le même principe, la différence majeure entre ces approches est la détection des produits de la réaction. Pour agir sur un substrat spécifique, une kinase a besoin de deux substrats : l'ATP, en tant que donneur du groupement phosphoryle, et la cible, reconnue par la kinase au niveau d'une séquence spécifique, correspondant à la séquence consensus, et constituée de 3 à 20 acides aminés (Wu et al., 2010). Ces motifs, assez courts, peuvent être générés au niveau de peptides indépendants, pouvant donc être utilisés comme substrat accepteur au lieu des protéines. L'utilisation de ces peptides à la place de protéines acceptrices peut présenter plusieurs avantages : (i) ils peuvent être purifiés plus facilement que les protéines ; (ii) leur production, notamment en grande quantité, reste relativement peu coûteuse ; (iii) ils se stockent et se manipulent aisément ; et (iv) ils peuvent être chimiquement modifiés pour faciliter leur purification en aval (Wu et al., 2010).

La première méthode développée était basée sur le marquage par radioactivité de la cible par le γ - $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ -ATP, l'incorporation du ^{32}P ou du ^{33}P sur la cible étant mesurée pour quantifier l'activité de la kinase. Cependant, l'utilisation de radioisotopes est à la fois coûteuse et pose des problèmes de retraitement des déchets, et constitue un risque pour la santé humaine et l'environnement. Ainsi, des méthodes alternatives, ne faisant pas appel à des radioisotopes, sont préférables. La seconde stratégie utilisait des pan-anticorps, reconnaissant les peptides phosphorylés dans une approche par ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), la « lecture » étant effectuée par fluorescence ou par luminescence (Akita et al., 2008 ; Han et al., 2010 ; Ross et al., 2002). Généralement, le peptide-substrat est immobilisé sur une plaque ELISA, puis, après réaction enzymatique, est détecté par hybridation avec un anticorps dirigé contre l'épitope phosphorylé. Cependant, certains anticorps présentent un bruit de fond élevé (en particulier lorsque des lysats sont utilisés pour la réaction), et une spécificité moindre vis-à-vis de la cible. De plus, l'accessibilité de ces substrats immobilisés peut être limitée de par la densité des peptides et leur orientation en surface de la plaque (Wu et al., 2010). Enfin, ces méthodes impliquent qu'un seul peptide-cible (et donc une seule activité kinase) peut être mesuré par puit.

3.2. Choix méthodologique : mesure d'activité kinase par spectrométrie de masse.

Le but de ce travail était de développer un système permettant la mesure simultanée de plusieurs activités enzymatiques, permettant donc d'établir un profil de différentes activités kinases et/ou phosphatases à partir de lysats cellulaires ou tissulaires. De par sa sensibilité et une utilisation (relativement) aisée, la spectrométrie de masse offre la possibilité de mesurer des activités enzymatiques correspondant à l'addition d'un groupement phosphorylé, que ce soit en MALDI-TOF (Sonoda et al., 2004) ou en SELDI-TOF (Ji et al., 2012 ; Thulasiraman et al., 2004). Ainsi, l'analyse d'activité kinase par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est une approche méthodologique ne nécessitant pas de marquage, offrant une « lecture » directe du substrat (le peptide non modifié) et du produit (le peptide phosphorylé), la liaison peptide-phosphate étant stable lors de l'analyse MALDI (Kang et al., 2007 ; Kondo & Nishimura, 2009 ; Parker et al., 2008 ; Sonoda et al., 2004), et permettant un taux d'échantillonnage élevé (Greis et al., 2006). Le substrat est un peptide synthétique de 10 à 15 acides aminés, contenant la séquence consensus de la kinase d'intérêt. Il est possible d'ajouter en N-terminal un résidu de cystéine, qui permettra le couplage entre le peptide et un agent de capture (biotine, His₆, FLAG...) (Kondo & Nishimura, 2009). Ces agents de capture peuvent être séparés du peptide par l'intermédiaire d'un lien hydrophile, par exemple un groupe polyéthylène glycol (PEG), permettant d'augmenter la solubilité en milieu aqueux, mais également de favoriser l'accessibilité à l'avidine ou aux anticorps (Tate, 2008). Le principe général de cette approche méthodologique est représenté figure 76. Comme on peut le voir ici, le peptide substrat est biotinylé, ce qui permet en aval sa purification sur des billes magnétiques couplées à la streptavidine.

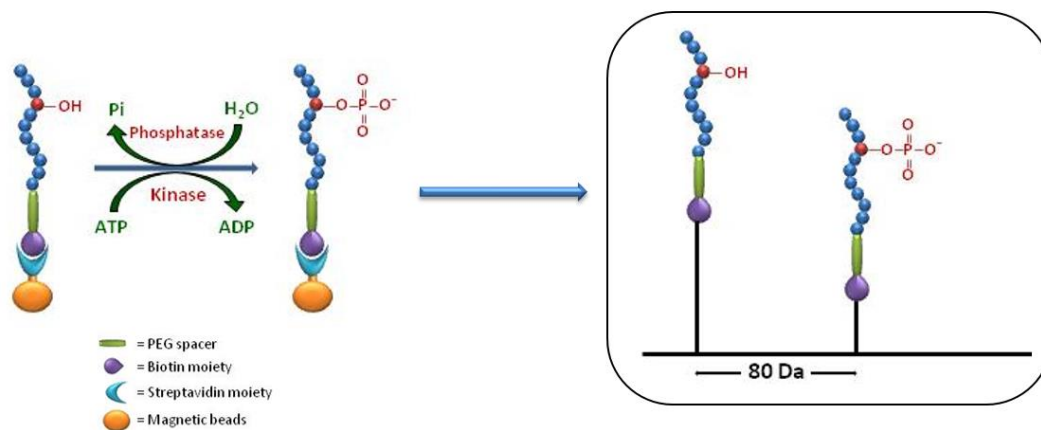


Figure 76 : Principe général de l'approche « label-free » de mesure d'activité kinase ou phosphatase par spectrométrie de masse par l'intermédiaire de son peptidique. (adapté de Zhou et al., 2011)

Le transfert d'un groupe phosphate sur le peptide-substrat, à partir du donneur ATP, conduit à une augmentation de masse de 79.96 Da ; le shift inverse peut être observé pour une activité phosphatase. Il est possible d'envisager de mesurer de multiples activités kinase simultanément à condition que chaque sonde peptidique, ainsi que le peptide phosphorylé, ait une masse moléculaire qui lui soit propre, et donc facilement distinguable en spectrométrie de

masse. Afin de normaliser les résultats entre différentes expériences, un standard interne doit être ajouté à chaque expérience. Il peut ainsi être possible d'envisager une mesure de l'activité enzymatique de manière quantitative (dans ce cas, une courbe de calibration peut être effectuée par dilution successive du peptide phosphorylé), ou de manière semi-quantitative (la surface du pic correspondant au peptide phosphorylé est comparé entre différents spectres de masse).

3.3. Mesure de l'activité de Akt par spectrométrie de masse.

Le peptide synthétique utilisé pour la mesure de l'activité d'Akt a la séquence suivante : COOH-ASEAFTAARPRGSGG(Biotine) ($M+H^+ = 1660.7$ Da) (McLean et al., 2009).

3.3.1. Limite de détection et pourcentage d'ionisation.

Nous avons tout d'abord déterminé la limite de détection de chaque peptide, plus particulièrement pour les peptides phosphorylés (et glycosylés) dans la mesure où la limite de détection en spectrométrie de masse est dépendante de plusieurs facteurs tels que l'efficacité d'ionisation, la masse et l'hydrophobicité. Nous avons testé la dilution du peptide dans différentes matrices telles que l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide sinapinique (AS) ou la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP), dans différents pourcentage du mélange acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique (TFA) (Parker et al., 2006). La détection a également été optimisée par l'utilisation de différents ratios entre la matrice et le peptide, ou par l'intensité du laser.

Nous avons ainsi testé différentes quantités de peptides déposés sur la cible (1 μ g, 300ng, 30ng, 3ng, 300pg, 30pg, 3pg, 300femtog), et déterminé la limite de détection à 30 pg. Nous avons également déterminé l'efficacité d'ionisation entre un peptide non modifié, un peptide phosphorylé, et un peptide glycosylé (j'expliquerai ci-après pourquoi nous nous sommes également intéressés à un peptide synthétique modifié par la O-GlcNAcylation). Nous avons ainsi déterminé un ratio d'intensité phospho-peptide et glyco-peptide par rapport au peptide non modifié de 1.47 et de 1.59 respectivement (figure 77).

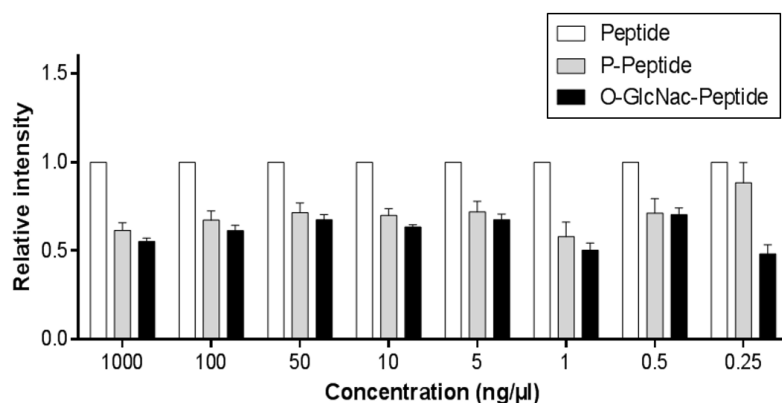


Figure 77 : Détermination de l'efficacité d'ionisation d'un peptide phosphorylé et d'un peptide glycosylé par rapport à un peptide non modifié. L'intensité relative des signaux a été déterminée à partir de différentes concentrations de peptides (en ng/ μ l).

3.3.2. Résultats obtenus.

De multiples paramètres réactionnels ont été optimisés pour la mesure de l'activité d'Akt, à partir d'enzyme purifiée (commerciale), tels que la quantité d'enzyme, la quantité de peptide-substrat, le milieu réactionnel, la durée et la température de réaction enzymatique, etc... Nous avons également déterminé les conditions optimales de couplage des peptides sur les billes magnétiques d'avidine (ratio peptide/billes, température et durée de couplage), ainsi que leur condition d'élution (pourcentage d'acétonitrile, température). Cette activité a également été mesurée à partir de différents peptides-substrat. Enfin, nous avons également déterminé l'activité enzymatique sur un peptide avant ou après couplage sur les billes. Les résultats obtenus sont présentés figure 78. Comme on peut l'observer au niveau des différents spectres de masse, il y a une diminution progressive de l'intensité du pic correspondant au peptide non modifié, en parallèle de l'augmentation de l'intensité du pic avec un incrément de 80 Da, correspondant donc au peptide phosphorylé. Il est à noter que la durée minimale de réaction enzymatique est de 4 h, tandis que la réaction est totale lorsque la réaction enzymatique est effectuée sur la nuit (o/n) puisque le peptide non modifié n'est plus détecté.

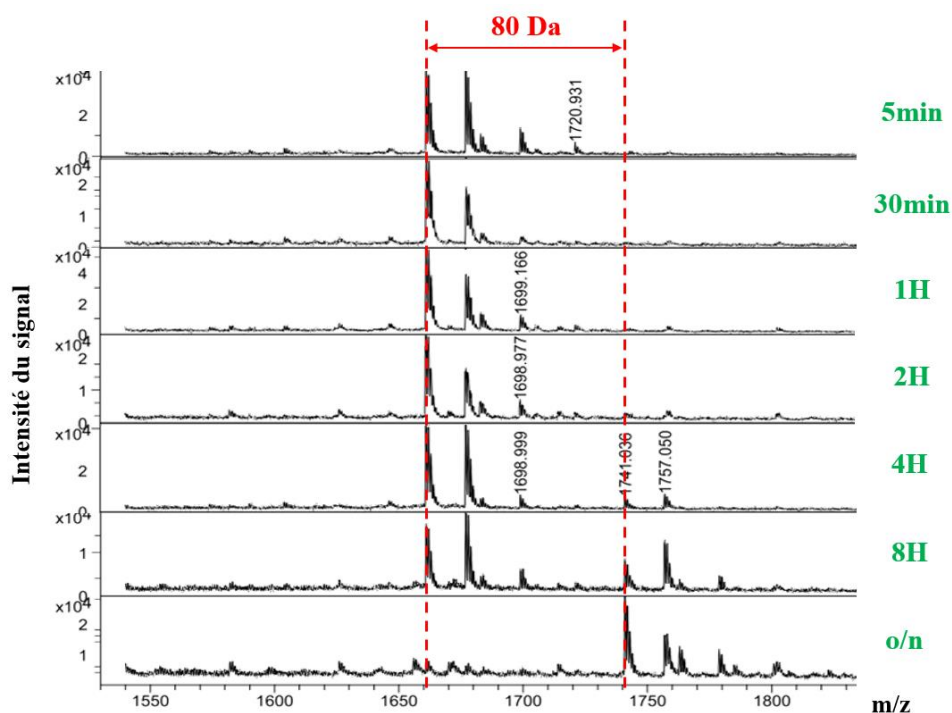


Figure 78 : Mesure de l'activité enzymatique d'Akt par spectrométrie de masse. Ces résultats ont été obtenus par mesure de l'activité de l'enzyme purifiée, à différents temps réactionnels. Le peptide non modifié a une masse de 1660.7 Da, et le peptide phosphorylé de 1740.7 Da.

Lorsque nous avons entrepris de mesurer l'activité enzymatique à partir d'extrait tissulaires ou cellulaires, le problème majeur était, comme nous pouvions nous y attendre, la quantité d'enzyme endogène. Un autre point critique restait la composition du tampon d'extraction, celui-ci pouvant potentiellement inhiber l'activité de l'enzyme. Nous avons donc testé différents tampons d'extraction, à partir d'extraits musculaires ou cellulaires. Malheureusement, dès lors que l'on travaille sur un lysat total, l'activité enzymatique

s'effectue difficilement, et nous avons des difficultés à observer le pic correspondant au peptide phosphorylé. Selon le protocole d'un kit commercial de mesure de l'activité d'Akt (Cell Signaling), il s'avère que l'enzyme endogène était immunoprécipitée avant d'effectuer l'activité enzymatique. Nous avons donc entrepris d'immunoprécipiter Akt à partir de nos lysats cellulaires ou tissulaires, à la fois selon le protocole du kit commercial, mais également après optimisation de notre protocole « classique » d'immunoprécipitation. D'après les résultats obtenus par spectrométrie de masse (figure 79), nous avons donc détecté un pic à une masse de 1740.7 Da, correspondant donc au peptide substrat phosphorylé par l'Akt endogène d'un échantillon musculaire après immuno-précipitation de l'enzyme.

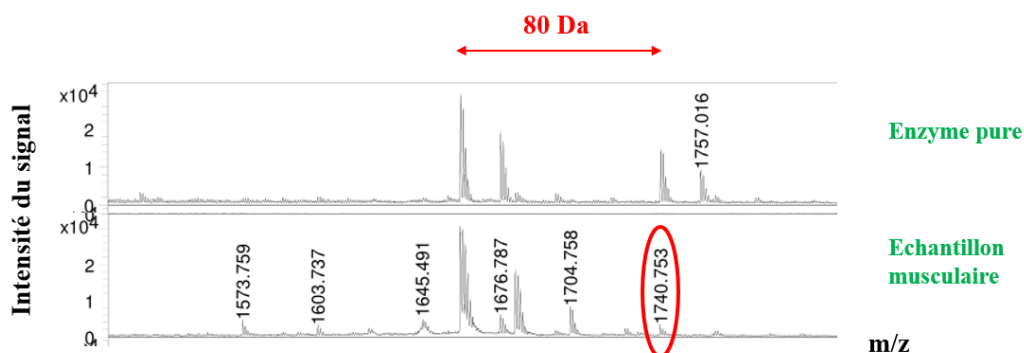


Figure 79 : Mesure de l'activité enzymatique d'Akt par spectrométrie de masse à partir d'un extrait protéique. Détection du peptide phosphorylé après 4h de réaction enzymatique pour l'enzyme pure ainsi que pour un extrait de protéines musculaire (après immunoprécipitation de l'enzyme).

3.4. Mesure de l'activité de l'OGT par spectrométrie de masse.

L'activité de l'OGT est généralement déterminée par mesure de la radioactivité incorporée sur le peptide synthétique YSDSPSTST après transfert de GlcNAc tritiée à partir du donneur radiomarqué UDP-[³H]GlcNAc (Lefebvre et al., 2013 ; Zachara et al., 2004a) ; nous avons utilisé cette approche il y a quelques années pour mesurer la variation d'activité de l'OGT lors de l'HH, comme nous l'avons vu précédemment (Cieniewski-Bernard et al., 2006), l'inconvénient majeur de cette approche étant l'utilisation de composés radiomarqués. Il a également été décrit une méthode consistant en la mesure de l'UDP issu de la réaction de glycosylation (Zhang et al., 2009), mais l'UDP n'est pas uniquement issu de la réaction de O-GlcNAcylation. Une méthode plus récente, développée par l'équipe de Carolyn Bertozzi, consiste en la mesure de l'activité de l'OGT par azido-ELISA. Des peptides synthétiques sont fixés dans une plaque ELISA pour servir de substrat à l'OGT, qui va transférer un résidu de GlcNAz à partir du donneur UDP-GlcNAz (Leavy & Bertozzi, 2007) Cette fonction azide pourra être couplée, par la Click chemistry, à un FLAG-phosphine, qui sera reconnu par un anti-FLAG-HRP pour permettre la détection (et la quantification) colorimétrique ; il est à noter que cette méthodologie a été appliquée à l'OGT purifiée.

Nous pouvons également envisager de mesurer l'activité OGT par spectrométrie de masse, selon la même stratégie méthodologique que pour la mesure d'activité kinase ; il est à noter que la quantification d'activité glycosyltransférase a déjà été effectuée par SELDI-MS-TOF (Freire et al., 2006). Nous avons également procédé à l'optimisation de nombreux

paramètres (comme ceux cités ci-dessus), notamment en ce qui concerne la réaction enzymatique. L'activité de l'OGT a ainsi été déterminé par spectrométrie de masse à partir du peptide accepteur $\text{NH}_2\text{-AIPVJRAEK(Biotine)-COOH}$ (Leavy & Bertozzi, 2007) ($M+H^+ = 1196.7$ Da), comme on peut le voir figure 80.

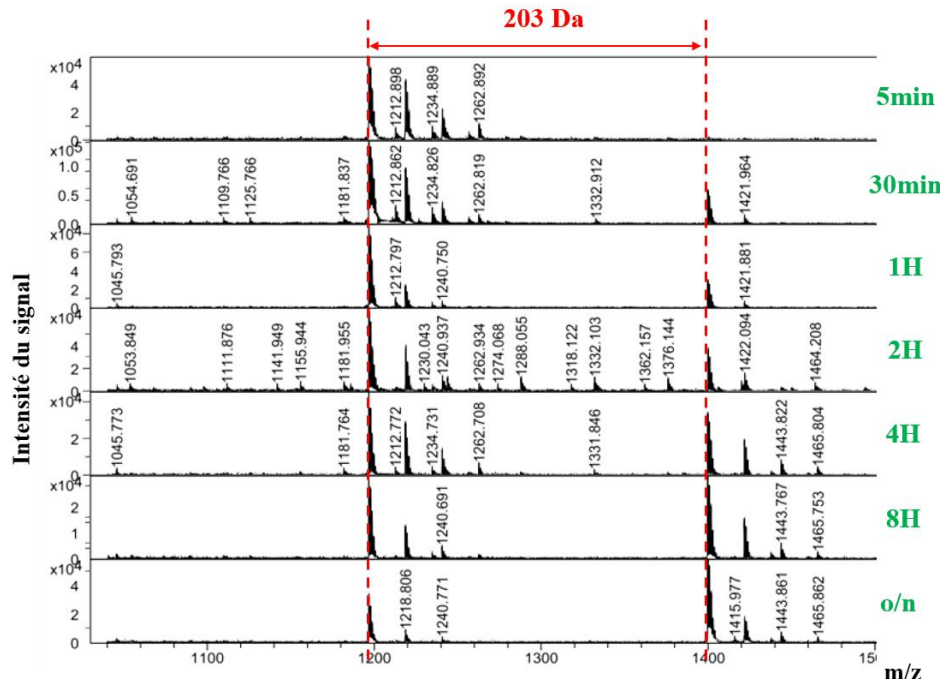


Figure 80 : Mesure de l'activité enzymatique de l'OGT par spectrométrie de masse. Ces résultats ont été obtenus par mesure de l'activité de l'enzyme purifiée, à différents temps réactionnels. Le peptide non modifié a une masse de 1196.7 Da, et le peptide glycosylé de 1399.7 Da.

Comme on peut l'observer au niveau des différents spectres de masse, il y a une augmentation progressive de l'intensité du pic correspondant au peptide glycosylé, tandis que l'intensité du pic non modifié diminue progressivement au cours du temps. Il est à noter que même après une réaction effectuée sur la nuit (o/n), le peptide non modifié est encore détecté, bien que son signal soit très faible. Cette méthodologie fait l'objet d'une publication en cours de rédaction pour soumission à *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (Deracinois et al., 2015b).

4. Discussion & perspectives.

4.1. O-GlcNAcylation et atrophie fonctionnelle.

Nous avons mis en évidence que la O-GlcNAcylation pouvait être impliquée dans l'atrophie fonctionnelle du muscle squelettique, atrophie induite par l'hypodynamie-hypokinésie. De manière plus précise, nos résultats indiquent que le taux global de O-GlcNAcylation diminue en parallèle du développement de l'atrophie du soléaire, tandis que le taux augmente dans l'EDL, non touché par l'atrophie fonctionnelle. Nous avons émis l'hypothèse que la O-GlcNAcylation pourrait avoir un effet protecteur vis-à-vis de la dégradation protéasomale. Il serait donc intéressant de moduler le taux de O-GlcNAcylation

au niveau musculaire chez le rat soumis à l'hypodynamie-hypokinésie, et d'en déterminer la répercussion sur le développement de l'atrophie fonctionnelle au niveau du muscle soléaire, tout en considérant en parallèle l'EDL. L'analyse de l'état d'activation des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régulation de la masse musculaire pourra également être effectuée, de même qu'une analyse fonctionnelle afin de déterminer si cette modulation du taux de O-GlcNAcylation peut contrecarrer la perte de fonction contractile du soléaire.

4.2. Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'homéostasie protéique.

Nous avons obtenu de multiples données concernant l'effet de la O-GlcNAcylation sur la voie de signalisation de l'IGF-1, mais certains résultats semblent indiquer que l'effet de la O-GlcNAcylation est beaucoup plus complexe que ce qui était initialement attendu. En effet, nos résultats indiquent que le taux basal d'activation d'Akt est diminué lors de l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation. Cependant, cet effet inhibiteur de l'augmentation de O-GlcNAcylation des myotubes C2C12 disparaît lorsque l'activation de la voie de l'IGF-1 se fait à des doses plus élevée du facteur de croissance.

Cette diminution de taux basal d'activation d'Akt ainsi que de son activation à de faibles concentrations d'IGF-1 peut être corrélée à de nombreuses données bibliographiques, qui ont mis en évidence que l'augmentation de O-GlcNAcylation était associée à une diminution de la phosphorylation d'Akt (Vosseller et al., 2002 ; Wang et al., 2012 ; Whelan et al., 2010 ; Yang et al., 2008). Ces données bibliographiques traduisent le fait que la O-GlcNAcylation interviendrait dans l'atténuation de la voie de signalisation dépendante de l'insuline ; il avait notamment été montré que les événements en aval d'Akt dans cette voie de l'insuline étaient altérés (Slawson et al., 2010). Cependant, l'impact réel de la dynamique phosphorylation/O-GlcNAcylation sur la protéine Akt reste sujet à discussion. En effet, d'autres travaux ont au contraire montré que l'augmentation de O-GlcNAcylation n'aurait pas d'effet sur Akt (Arias et al., 2004 ; Gandy et al., 2006), et qu'il semblerait que la localisation subcellulaire d'Akt soit différente tandis que son activation n'est pas modifiée (Gandy et al., 2006). Enfin, il a aussi été montré que l'augmentation de O-GlcNAcylation conduisait à une augmentation de la phosphorylation d'Akt, *via* l'augmentation du PIP₃ (Kanwal et al., 2013), et qu'il y avait potentialisation de l'état d'activation d'Akt lors du co-traitement PUGNAc-IGF-1 (Krzeslak et al., 2011). Il semblerait donc que le rôle de la O-GlcNAcylation sur la voie PI3K/Akt pourrait être dépendant du type de cellules ou de tissus (Shi et al., 2012), ou que des disparités dans les conclusions seraient dues aux protocoles expérimentaux utilisés.

Nos données indiquent également que des protéines en aval d'Akt voient leur taux de phosphorylation augmenté (notamment 4EBP1 ou P-TSC2) lors de l'augmentation de la O-GlcNAcylation en parallèle du traitement à l'IGF-1. Certaines données nous suggèrent également que la O-GlcNAcylation pourrait influencer sur la localisation de certaines protéines telles que TSC2. Il sera nécessaire dans le futur de clarifier de rôle exercé par la O-GlcNAcylation sur l'activité et/ou la localisation de ces protéines. Il est intéressant de souligner que la voie PI3K/Akt n'est pas la seule voie de signalisation conduisant à

l'activation de mTOR. En effet, le complexe TSC1-TSC2 a émergé comme un carrefour des signaux de transduction puisqu'il reçoit plusieurs informations issues de processus cellulaires distincts. L'activité de TSC1-TSC2 est ainsi modulée par un large spectre de protéines kinases (figure 81), liant étroitement TSC1-TSC2 aux voies de signalisation dépendantes des nutriments et des facteurs de croissance, à la voie des MAPK, à l'AMPK... (Curatolo & Moavero, 2012 ; Huang & Manning, 2009). L'implication du complexe TSC1-TSC2 est bien documentée dans le processus de cancérisation, les désordres neurodégénératifs, l'hypertrophie cardiaque ... (Hafen, 2004 ; Mieulet & Lamb, 2010) ; dans le système musculaire squelettique, il a été démontré que des souris surexprimant TSC1 présentent une atrophie musculaire (Wan et al., 2006).

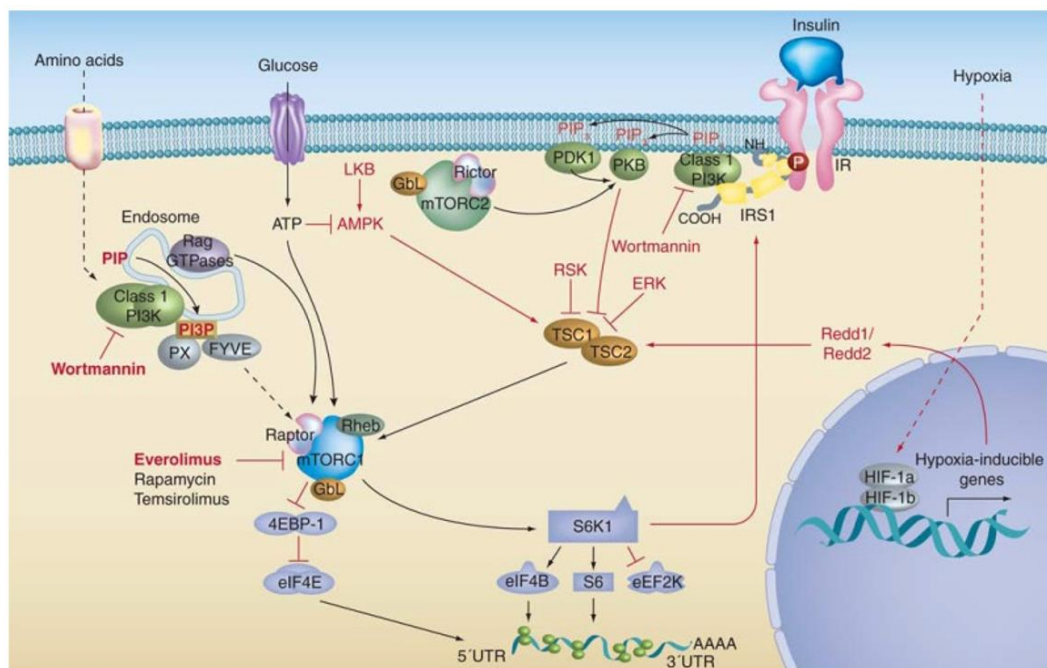


Figure 81 : Modulation du complexe TSC1-TSC2 par différents signaux intra- et extra-cellulaires (acides aminés, glucose, insuline...) et son rôle sur le complexe mTOR. (d'après Curatolo & Moavero, 2012).

Enfin, pour répondre à la question de l'effet de la O-GlcNAcylation sur la néosynthèse protéique, nous avons mis en place au laboratoire une méthodologie de mesure de la néosynthèse protéique, ce qui nous a permis de lever un verrou scientifique concernant le rôle effectif de la O-GlcNAcylation sur la synthèse protéique. Nous finaliserons également cette analyse en nous focalisant sur TSC1-TSC2, sa localisation, son état de phosphorylation et de O-GlcNAcylation. Un point essentiel pour achever ces travaux est la quantification de la variation de O-GlcNAcylation sur les protéines d'intérêt que nous avons identifié comme O-GlcNAcylées.

Outre son implication dans la modulation de la voie PI3K/Akt, la O-GlcNAcylation est également impliquée dans la modulation d'autres voies de signalisation, telle que la voie de l'AMPK (Bullen et al., 2014), les voies des p38 MAPK, ERK et PKC (Goldberg et al., 2011). En effet, au cours de nos travaux concernant la localisation des sites de O-

GlcNAcylation, nous avons identifié des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation (telles que la voie des MAPK, la voie des interleukines, ou la voie dépendante du TGF- β (figure 46, p89). Il sera donc nécessaire dans le futur de caractériser l'effet d'une variation de la O-GlcNAcylation sur l'état d'activation de ces voies. Nous avons proposé le développement d'une méthodologie permettant la mesure d'activités kinases sans utilisation de la radioactivité, stratégie prometteuse et puissante dans le cadre de la mesure des activités enzymatiques au sein d'un tissu. Il est envisagé de finaliser la méthodologie de mesure d'activités kinases par spectrométrie de masse, afin de l'appliquer à des protéines clés des autres voies de signalisation cellulaires.

Nous ne pouvons exclure qu'un autre processus cellulaire puisse être impliqué dans la modulation de la synthèse protéique. En effet, nous avons identifié un grand nombre de protéines ribosomales modifiées par la O-GlcNAcylation, comme cela avait déjà été décrit dans la littérature (Zeidan et al., 2010). Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique supramoléculaire au cœur de la machinerie de la traduction, permettant de traduire un ARNm en protéine. La biogénèse ribosomale est un facteur déterminant dans la capacité traductionnelle d'une cellule, et de nombreuses données montrent que cette biogénèse ribosomale a une place importante dans la régulation de l'homéostasie protéique (Chaillou et al., 2014). Cette biogénèse ribosomale est sous le contrôle de la signalisation Wnt/ β -caténine/c-Myc (Dai & Lu, 2008 ; Gomez-Roman et al., 2006 ; van Riggelen et al., 2010), qui présente des interactions avec la voie Akt/mTOR (von Maltzahn et al., 2012), voies dans lesquelles la O-GlcNAcylation est impliquée. Or, la voie Wnt/ β -caténine/c-Myc est modulée en réponse à l'activité contractile, mais également dans certaines conditions d'atrophie musculaire (immobilisation, hypodynamie-hypokinésie, inactivité physique...) (Chaillou et al., 2014). Il pourrait donc être intéressant de caractériser le rôle de la O-GlcNAcylation dans la biogénèse mitochondriale et la voie Wnt/ β -caténine/c-Myc, et notamment lors de l'atrophie fonctionnelle.

CHAPITRE IV

O-GlcNAcylation & structuration sarcomérique

CHAPITRE IV

O-GlcNAcylation & structuration sarcomérique

Depuis ces dix dernières années, de plus en plus de données démontrent un rôle clé de la O-GlcNAcylation dans la physiologie du muscle squelettique (pour revue, Cieniewski-Bernard et al., 2014c). Au laboratoire, un certain nombre de données supportent l'hypothèse que la O-GlcNAcylation est un acteur important dans la structuration du sarcomère (comme nous le verrons par la suite dans ce chapitre). C'est dans ce contexte qu'un nouveau projet de recherche a émergé au laboratoire, initié avec le soutien de la région Nord-Pas-de-Calais (programme Projets émergents, « Rôle de la O-GlcNAcylation dans la structuration du sarcomère et sa réorganisation au cours de pathologies musculaires », projet que j'ai coordonné en 2013-2014). Dans le cadre de ce projet de recherche, j'ai co-encadré Floriane ADRIANSSEN et encadré Amandine GIRARD pour leur Master 2 Recherche, ainsi que Matthias LAMBERT, que j'ai encadré lors de son Master 2 Recherche, et que je co-encadre avec le Pr Bruno BASTIDE pour sa thèse. Matthias débute actuellement sa dernière année de thèse. Les résultats présentés ci-après ont fait l'objet de deux communications orales, présentées par Matthias, lors de l'European Muscle Congress (EMC 2014, Salzbourg, Autriche) (Lambert et al., 2015b) et lors de la Journée André Verbert cette année (15^{ème} Journée André Verbert, 2015, Lille). Ces résultats ont également fait l'objet d'une publication en cours de révision dans Journal of Biological Chemistry (Lambert et al., 2015a).

1. Revue de littérature : quels sont les arguments supportant le rôle de la O-GlcNAcylation dans l'organisation sarcomérique ?

1.1. Cytoarchitecture cellulaire et interactions protéine-protéine.

Le muscle strié est une machinerie complexe, efficace, et extrêmement précise, constitué de myofibrilles hautement spécialisées. La contraction du muscle squelettique peut générer une force grâce à des réseaux cytosquelettiques interconnectés (Clark et al., 2002). Le sarcomère, unité fonctionnelle du muscle strié, est un assemblage macromoléculaire très complexe et extrêmement organisé, nécessitant une localisation précise et régulée des protéines constitutives. Le sarcomère résulte d'un arrangement régulier entre deux filaments : les filaments fins et épais, composés principalement d'actine et de myosine, protéines motrices impliquées dans la génération de la force contractile. La titine complète cette organisation sarcomérique ; cette protéine « géante » est un véritable échafaudage permettant l'ancrage de plusieurs protéines partenaires et régulant leur localisation subsarcomérique. La titine, de par ses propriétés élastiques, va moduler l'activité contractile mais également réguler certaines voies de signalisation intracellulaires (Kontogianni-Konstantopoulos et al.,

2009). Tandis que les filaments fins et épais interagissent pour générer la force de contraction, d'autres protéines constituent un réseau complexe et interconnecté, qualifié aujourd'hui de « cytosquelette sarcomérique » (Gautel, 2011), dont le rôle est la régulation de la fonction du sarcomère et d'assurer une fonction contractile efficace. L'absence de certaines protéines clés conduit à des pathologies musculaires, comme la dystrophine dans la myopathie de Duchenne.

Etonnamment, alors que l'appareil contractile constitue une structure présentant une organisation extrêmement stricte, cette architecture n'est ni passive, ni statique. En effet, cette structure semi-cristalline est dynamique, résultant de changements constants mais coordonnées de l'homéostasie protéique (Boonyarom & Inui, 2006), de même que son assemblage et son maintien (Clark et al., 2002). Ce dynamisme est modulé par des interactions protéines-protéines, en particulier au niveau de deux points nodaux du sarcomère : la ligne M et la strie Z (comme nous l'avons vu dans la revue générale concernant le muscle squelettique, au paragraphe 3.2. « Les filaments intermédiaires. »). Enfin, il est important de souligner que des protéines de signalisation et des systèmes protéolytiques sont localisées au niveau de la ligne M et du disque Z (Bonaldo & Sandri, 2013 ; Boonyarom & Inui, 2006 ; Knoll et al., 2011). Ainsi, des fonctions additionnelles sont assignées au sarcomère, avec une importance émergente pour le turn-over protéique (Knoll et al., 2011). La dérégulation de ces processus de dégradation (notamment les calpaïnes et le système ubiquitine-protéasome) est impliquée dans le développement de l'atrophie musculaire, un syndrome consécutif à de nombreuses pathologies telles que les maladies neuromusculaires, le cancer, le diabète... (Bonaldo & Sandri, 2013). Aujourd'hui, le sarcomère n'est plus seulement considéré comme une machinerie contractile uniquement impliquée dans la génération d'une force, mais comme un véritable point nodal dans la physiologie et la physiopathologie musculaires (Schroder & Schoser, 2009), pouvant servir de cible pour des interventions pharmacologiques (Kho et al., 2012).

1.2. Interactions protéine-protéine et modifications post-traductionnelles.

Bien qu'il soit établi que la phosphorylation participe à la modulation d'interactions protéine-protéine impliquées dans la structuration du sarcomère, l'implication de la O-GlcNAcylation n'avait jamais été considérée. Pourtant, de nombreuses données supportent le rôle possible de cette glycosylation dans l'organisation et la ré-organisation du sarcomère. En effet, nous avons récemment que les deux enzymes impliquées dans le processus de O-GlcNAcylation sont localisées au niveau de la strie Z (Cieniewski-Bernard et al., 2014b), et de multiples protéines myofibrillaires sont O-GlcNAcylées, telles que l' α B-cristalline, l' α -actinine, la desmine (Cieniewski-Bernard et al., 2004 ; Cieniewski-Bernard et al., 2009 ; Cieniewski-Bernard et al., 2012), ainsi que la myotiline, la filamine C ou ZASP (données non publiées du laboratoire). Il est important de souligner que plusieurs maladies musculaires résultent de la mutation de protéines sarcomériques, comme la desmine, l' α B-cristalline, la myotiline, la ZASP, la filamine C, BAG3, FHL1 ou la plectine (Schroder & Schoser, 2009 ; Selcen, 2011). La mutation de l'une ou l'autre de ces protéines compromet la formation et ou le maintien des filaments par perte des interactions protéine-protéine ou de la polymérisation,

conduisant au développement des myopathies myofibrillaires. De manière intéressante, certains sites de O-GlcNAcylation correspondent à des sites de mutation étroitement associés avec le développement de pathologies musculaires telles que la myopathie de Laing (Hedou et al., 2009) ou les desminopathies (voir paragraphe 5 « Identification des sites de O-GlcNAcylation. » dans le chapitre I des travaux personnels. L'implication du rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation des interactions protéine-protéine est également renforcée par la localisation des sites de O-GlcNAcylation au niveau de la myosine (voir figure 82), certains d'entre eux étant localisés à proximité des domaines d'interaction entre la myosine et la titine ou la myoméline, mais également dans les domaines de polymérisation de la myosine (Hedou et al., 2009).

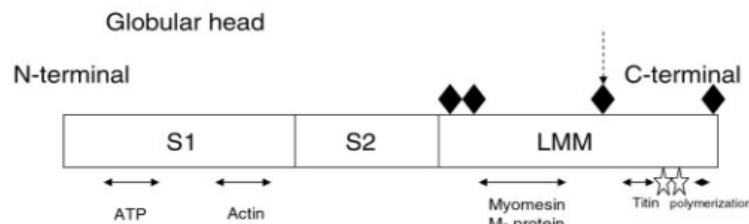


Figure 82 : Localisation des sites de O-GlcNAcylation au niveau de la myosine. Le domaine LMM (light meromyosin) correspond à la queue de la myosine, tandis que les domaines S1 et S2 constituent le domaine globulaire (ou heavy meromyosin). Notez la localisation des sites de O-GlcNAcylation (losanges noirs) dans le domaine LMM où se trouvent les domaines de polymérisation de la myosine, ainsi que des domaines d'interaction protéine-protéine avec d'autres protéines structurales. (modifié d'après Hedou et al., 2009).

D'autres données bibliographiques ont déjà souligné le rôle de la O-GlcNAcylation dans le mécanisme de polymérisation des protéines ainsi que dans les interactions protéine-protéine. Parmi toutes ces protéines structurales, bon nombre d'entre elles sont modifiées par la O-GlcNAcylation : l'intégrine beta3 (Ahmad et al., 2006), la vinculine (Laczy et al., 2010), la spectrine (Zhang & Bennett, 1996), l' α B-cristalline (Roquemore et al., 1996), certaines laminines (Kwak et al., 2010) ou encore des cytokératines (Ku & Omary, 1995). Il a été démontré que le pattern de O-GlcNAcylation des filaments intermédiaires jouait un rôle dans la modulation de leur phosphorylation (Farach & Galileo, 2008 ; Slawson et al., 2008), la phosphorylation étant connue comme modulant le degré de polymérisation des filaments intermédiaires (Sihag et al., 2007). L'ensemble de ces travaux dénotent donc de l'importance de la O-GlcNAcylation dans la structuration des filaments intermédiaires. Au niveau du muscle squelettique, les filaments intermédiaires permettent la transmission de force, le maintien de l'intégrité cellulaire et par extension du tissu, d'autant plus que la O-GlcNAcylation est impliquée dans l'organisation et la solubilisation des filaments de cytokératines (Srikanth et al., 2010) ou encore dans leur réponse au stress (Rotty et al., 2010). De manière intéressante, il a récemment été mis en évidence que la vimentine et la desmine possédaient des propriétés lectiniques vis-à-vis du motif O-GlcNAc (Ise et al., 2010), suggérant donc une interaction protéine-protéine qui puisse dépendre du motif O-GlcNAc. Toutes ces données supportent notre hypothèse selon laquelle la O-GlcNAcylation pourrait être impliquée dans la cytoarchitecture cellulaire, potentiellement *via* les filaments intermédiaires, ainsi que dans l'organisation sarcomérique du muscle squelettique.

1.3. O-GlcNAcylation et protéines structurales.

Au cours de précédents projets de recherche, nous avons démontré au laboratoire qu'outre la O-GlcNAcylation de protéines contractiles (motrices et régulatrices), certaines protéines structurales étaient O-GlcNAcylées. Par une stratégie de Click Chemistry que nous avons décrite précédemment, nous avons récemment identifié un grand nombre de protéines O-GlcNAcylées (voir chapitre « O-GlcNAcylation, protéomique et développements méthodologiques »), parmi lesquelles des protéines structurales. A partir de ces données expérimentales (Deracinois et al., 2015a), mais également à partir de nombreuses données bibliographiques, j'ai indiqué sur la représentation schématique de la figure 83 et dans le tableau VIII les protéines connues comme O-GlcNAcylées.

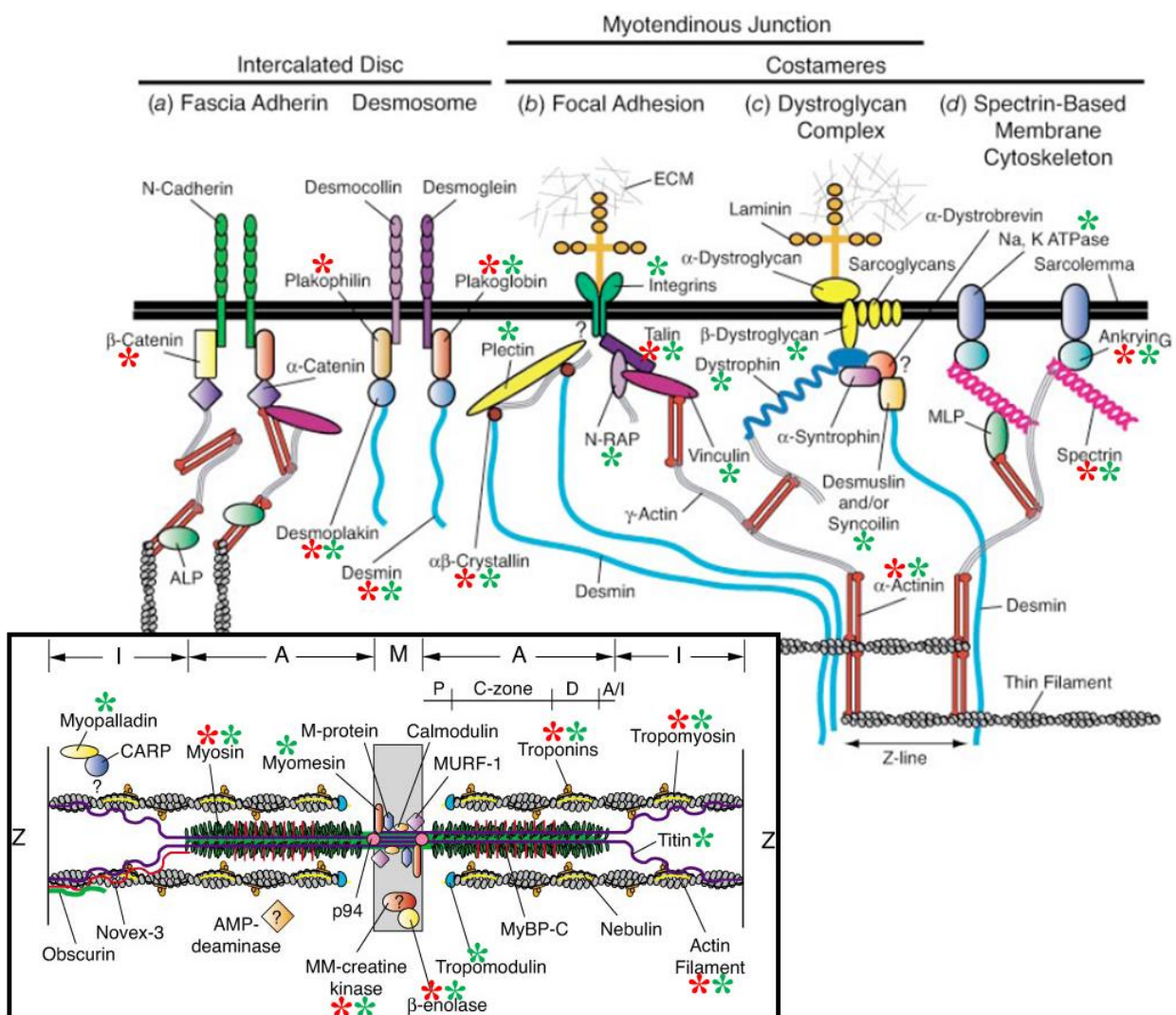


Figure 83 : Cartographie des protéines O-GlcNAcylées des filaments cytosquelettiques associant les myofibrilles au sarcolemme. Sont indiquées sur le schéma les protéines décrites dans la littérature comme O-GlcNAcylées (*) et/ou celles identifiées expérimentalement au laboratoire (*). (schéma modifié d'après Clark et al., 2002).

Tableau VIII : Protéines structurales des filaments intermédiaires modifiées par la O-GlcNAcylation, indiquées figure 83. Ces données sont issues de références bibliographiques, ou obtenues expérimentalement au laboratoire selon la méthodologie de Click Chemistry détaillée précédemment. La (les) fonction(s) principale(s) de ces protéines sont indiquées (d'après les données de la banque UniProtKB, <http://www.expasy.org/>)

Protéine	Fonction(s) principale(s)	Référence bibliographique	Identifiée par Click Chemistry
Actine cytoplasmique	Liée au domaine cytoplasmique de la E-cadhérine, impliquée dans l'adhésion cellule-cellule ; composant clé de la voie de signalisation Wnt.	(Nandi et al., 2006)	×
α-actinine	Permet d'ancrage de l'actine F à différentes structures intracellulaire ; colocalise avec MYOZ1 et FLNC au niveau des disques Z.	(Nandi et al., 2006)	×
αB-cristalline	Chaperon moléculaire, prévenant l'agrégation de diverses protéines lors de stress cellulaires.	(Roquemore et al., 1996)	×
Ankyrine G	Lie des protéines membranaires à des éléments du cytosquelette. Se lie (entre autres à la Na-K ATPase, à la tubuline, la vimentine, la desmine.	(Vosseller et al., 2006)	×
β-caténine	S'associe avec les cadhérines formant un complexe lié au réseau d'actine filamentaire. Essentielle à la voie Wnt.	(Lefebvre et al., 2004a)	/
β-dystroglycane	Impliqué dans un grand nombre de processus incluant les laminines et l'assemblage de la lame basale, la stabilité du sarcolemme, la survie cellulaire... Connexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette.	/	×
β-énolase	Enzyme de la glycolyse, localisée au niveau du disque Z ; rôle dans le développement et la régénération du muscle strié.	(Cieniewski-Bernard et al., 2004)	×
Desmine	Protéines des filaments intermédiaires de type III dans les cellules musculaires. Forme un réseau fibreux permettant de connecter les myofibrilles entre elles, et au sarcolemme.	(Cieniewski-Bernard et al., 2012)	×
Desmoplakine (desmoplakine 3)	Protéine de la plaque jonctionnelle, élément structural clé pour l'arrangement et la fonction du cytosquelette et des cellules au sein d'un tissu.	(Chalkley et al., 2009)	×
Dystrophine	Fonction structurale de stabilisation du sarcolemme, également impliquées dans les événements de transmission synaptique.	/	×
Intégrines	Impliquée dans le maintien de la cytoarchitecture des fibres musculaire, ainsi que leur ancrage, leur viabilité et leur intégrité fonctionnelle.	/	×
Plakophiline	Rôle structural pour les plaques jonctionnelles.	(Chalkley et al., 2009)	
Plakoglobine	Protéine commune de la plaque jonctionnelle ; éléments architecturaux importants dans l'arran-	(Hatsell et al., 2003)	×

	gement et la fonction du cytosquelette et des cellules au sein d'un tissu.		
Plectine	Lien entre les filaments intermédiaires et les microtubules et les microfilaments, ainsi que leur ancrage aux desmosomes et hémi-desmosomes.	/	×
MM-créatine kinase	Catalyse le transfert réversible d'un phosphate entre l'ATP et la créatine.	(Cieniewski-Bernard et al., 2004)	×
Myoméline	Composant majeur de la bande M au niveau du sarcomère. Associée à la myosine et à la titine. Permet la liaison entre les filaments intermédiaires et le disque M des myofibrilles des muscles striés.	/	×
Myopalladine	Composant du sarcomère qui ancre la nébuline à l' α -actinine.	/	×
Myosine (myosine 9)	Joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette.	(Nandi et al., 2006)	×
Na, K ATPase (sous-unité β)	Composant non catalytique de la Na/K ATPase ; régulation du nombre de pompes sodiques à la membrane.	/	×
N-RAP (nebulin-related anchoring protein)	Peut être impliqué dans l'ancrage des filaments d'actine de la myofibrille à la membrane et dans la transmission de la tension des myofibrilles à la matrice extracellulaire.	/	×
Spectrine	Interagit avec la calmoduline de manière Ca^{2+} -dépendante ; impliquée dans les mouvements du cytosquelette à la membrane.	(Khidekel et al., 2004)	×
Taline	Probablement impliquée dans la connexion des structures cytosquelettiques majeures à la membrane.	(Hagmann et al., 1992)	×
Titine	Composant clé dans l'assemblage et la fonction des muscles striés. Confère la propriété d'extensibilité au muscle.	/	×
Vinculine	Rôle dans l'adhésion cellule-matrice et cellule-cellule et dans la mécanotransduction.	/	×
Tropomoduline	Bloque l'élongation et la dépolymérisation des filaments d'actine. Impliquée dans la formation des protofilaments d'actine.	/	×

2. Stratégie expérimentale.

L'ensemble des travaux décrits ci-après ont été réalisés sur des myotubes différenciés de type C2C12, ces cellules ayant la capacité de se différencier rapidement, de produire les protéines spécifiques du tissu musculaire, et de former en leur sein des myofibrilles et des sarcomères matures (Burattini et al., 2004). Dans ce sens, les myotubes C2C12 sont comparables à des fibres musculaires primitives. Nous avons déterminé le stade approprié de maturation des myotubes et du sarcomère pour cette étude, correspondant au cinquième jour de différenciation, stade auquel les protéines de structure et les protéines contractiles ont leur

taux d'expression maximal pour la majorité des protéines, et où le sarcomère est mis en place.

Nous avons modulé le taux global de O-GlcNAcylation des myotubes, notamment par le traitement des myotubes avec le Thiamet G (Macauley & Vocadlo, 2010 ; Yuzwa et al., 2008) ou avec la 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), inhibant la GFAT, enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines (Kang et al., 2009). Pour chaque inhibiteur, et pour chaque concentration et durée de traitement, l'état de maturation des myotubes et du sarcomère est mesuré grâce à l'index de fusion (myotubes avec au moins 2 noyaux) et à la quantification du niveau d'expression des MHC (chaines lourdes de myosine) par western blot. L'éventuelle toxicité des traitements a été évaluée par un test de viabilité cellulaire au MTT (Méthylthiazoletetrazolium) et mesure des sels de formazan formés. L'efficacité des traitements sur l'inhibition des enzymes est déterminée par la mesure du taux d'UDP-GlcNAc par HPLC sur colonne échangeuse d'anions et le dosage de l'activité de l'OGA (mesure de la quantité de PNP libéré à partir du PNP-GlcNAc). Enfin, le niveau d'expression des enzymes GFAT, OGT et OGA, ainsi que le taux global de O-GlcNAcylation sont analysés par western blot sur l'extrait protéique total ainsi que sur la fraction myofibrillaire.

3. Variations de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires et leurs effets sur la morphométrie du sarcomère.

3.1. Effet des traitements sur les myotubes C2C12 matures : la fraction myofilamentaire, plus sensible à la variation de O-GlcNAcylation.

Lorsque les cellules ont été traitées au DON, nous avons mesuré une diminution significative et dose-dépendante du taux d'UDP-GlcNAc, tandis que le Thiamet G n'influe pas sur le taux d'UDP-GlcNAc sauf à une dose élevée de 1 μ M (figure 84A). L'activité de l'OGA n'est diminuée significativement et de manière dose-dépendante qu'avec le traitement au Thiamet G (figure 84B). L'expression des enzymes (GFAT, OGT et OGA) n'est pas modifiée, quel que soient les traitements.

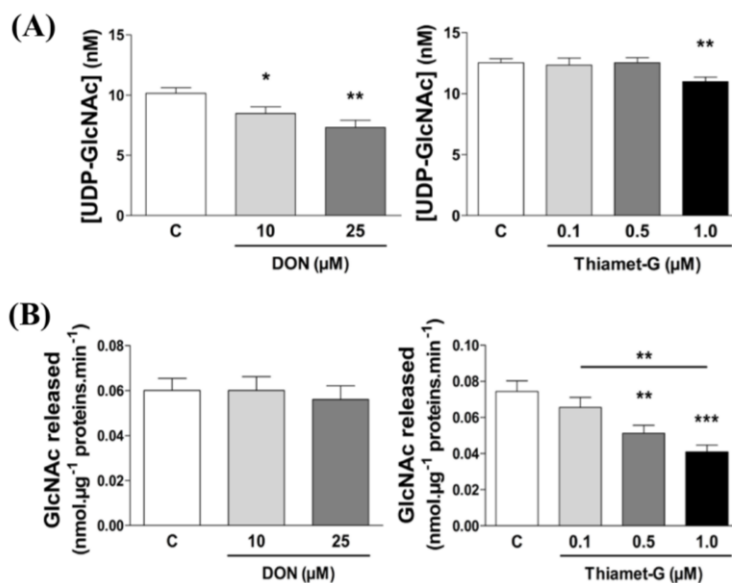


Figure 84 : Mesure du taux d'UDP-GlcNAc et de l'activité OGA suite aux traitements des myotubes avec le DON et avec le thiamet G. (A) Mesure du taux d'UDP-GlcNAc, produit final de la voie de synthèse des hexosamines, dont l'enzyme limitante est la GFAT, cible du DON. (B) Détermination de l'activité de l'OGA, enzyme responsable de la déglycosylation des protéines O-GlcNAcylées, et cible du thiamet G.

Nous avons également mesuré la variation du taux global de O-GlcNAcylation. Les résultats sont présentés figure 85. Le DON n'a pas d'effet sur le taux de O-GlcNAcylation de l'extrait total, tandis que nous pouvons noter une augmentation du taux global de O-GlcNAcylation avec le Thiamet G, maximale dès 0.5 μ M. Enfin, nous n'avons pas observé de réversion du taux de O-GlcNAcylation de la fraction totale. En revanche, le taux de O-GlcNAcylation de la fraction myofilaementaire répond de manière dose-dépendante à la fois au DON et au Thiamet G, mais de plus, présente une réversibilité lorsque l'inhibiteur est enlevé du milieu de culture. **La fraction myofilaementaire est donc beaucoup plus sensible à la variation du taux global de O-GlcNAcylation, et avec une dynamique plus marquée que pour l'extrait total.**

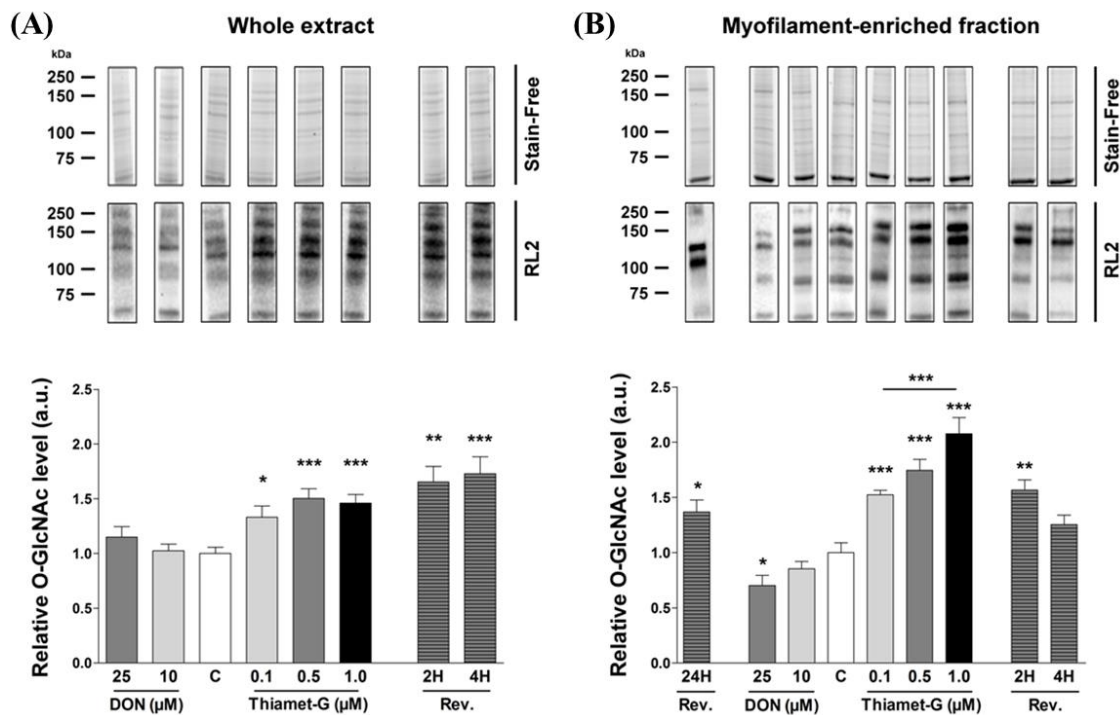


Figure 85 : Quantification du taux global relatif de O-GlcNAcylation. Le taux global de O-GlcNAcylation est déterminé par western blot après les traitements des myotubes au thiamet G et au DON, dans la fraction totale (A) et myofibrillaire (B). La quantification a été normalisée à la quantité totale de protéines déposée par puit (par l'intermédiaire de la technologie « stain free »), au témoin interne et au contrôle qui a été rapporté à la valeur de 1.

3.2. Répercussion de la variation du taux de O-GlcNAcylation des protéines myofilaementaires sur la morphométrie sarcomérique.

Afin de caractériser les effets de la variation du taux de O-GlcNAcylation sur la morphométrie sarcomérique, nous avons marqué par immunofluorescence les chaînes lourdes de myosine. Le marquage des MHC nous permet d'accéder à quatre informations essentielles quant à la morphométrie du sarcomère, et donc de sa structure. En effet, après acquisition des images en microscopie confocale, différentes stries et bandes sont mesurées (figure 86) : les largeurs des bandes sombres (en vert) et claires (en mauves), de la ligne M (en bleu) et, *in*

fine, la longueur du sarcomère (en rouge). Ces mesures sont ensuite rapportées au taux global relatif de O-GlcNAcylation des protéines myofibrillaires.

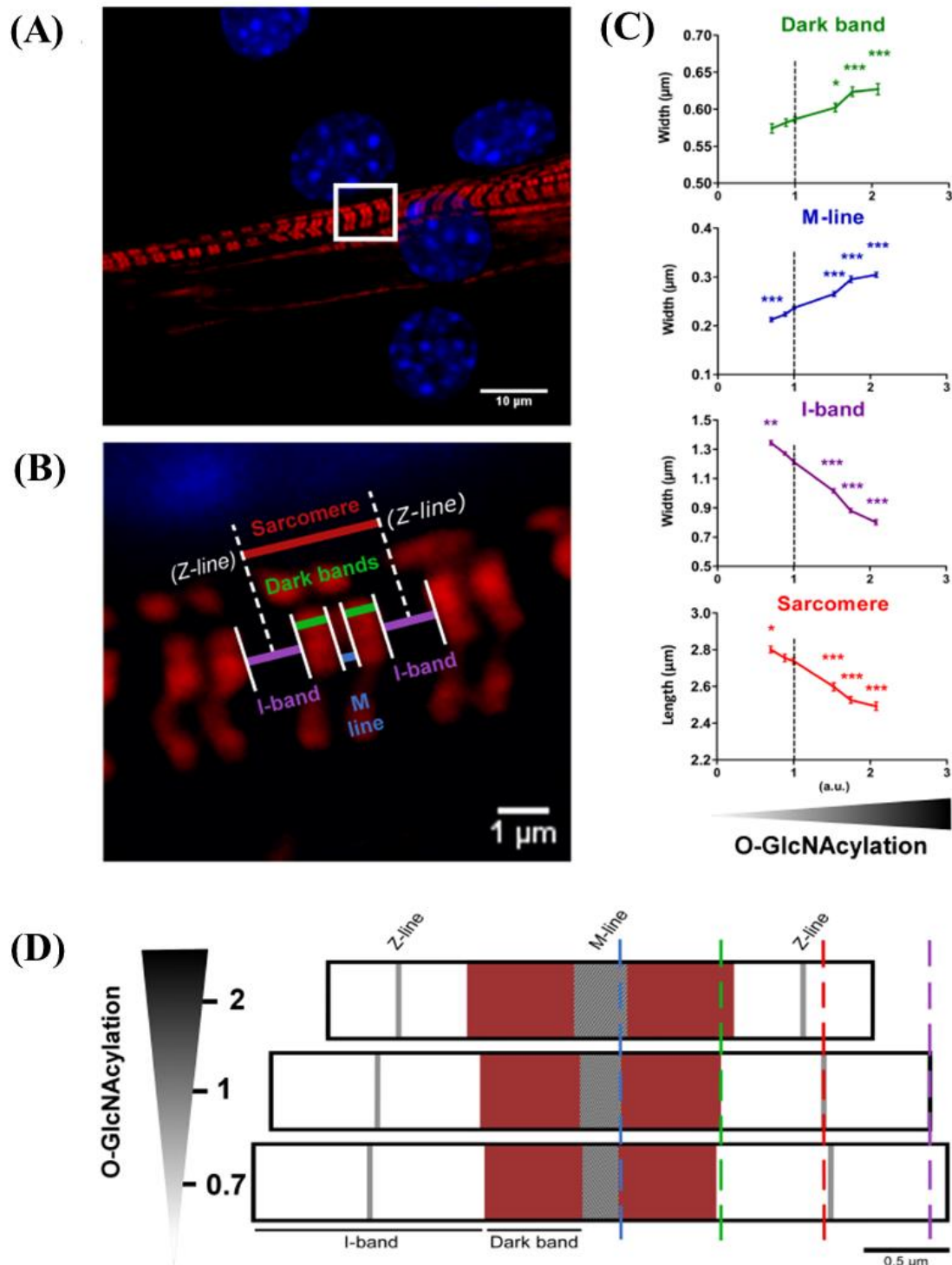


Figure 86 : Changements de la morphométrie sarcomérique selon la variation du taux global de O-GlcNAcylation de la fraction myofilamentaire. (A-B) Les striations des MHC (Alexa Fluor 555, en rouge) et les noyaux (DAPI, en bleu) sont visualisés par microscopie confocale ($\times 63$). (C) Détermination des variations de longueur/largeur de quatre paramètres morphométriques selon la variation du taux de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires ($N=3$; $n = 70$): bande sombre (en vert), ligne M (en bleu), bande claire (en mauve), sarcomère (en rouge). (D) Représentation schématique des changements de morphométrie du sarcomère (en μm) en fonction du taux global relatif de O-GlcNAcylation des protéines myofibrillaires.

Nous avons ainsi mesuré une augmentation de la largeur des bandes sombres, de la ligne M et une diminution de la largeur de la bande claire et de la longueur du sarcomère en fonction du taux de O-GlcNAcylation des protéines myofibrillaires. A noter que lors de la réversion de l'effet du Thiamet G, les valeurs reviennent progressivement à celle de l'état contrôle, ce qui démontre que l'effet observé est dynamique. Ces résultats démontrent que **la morphométrie de sarcomère dépend du taux global de O-GlcNAcylation des protéines de la fraction myofilamentaire**. Nous avons alors envisagé de déterminer si des interactions protéine-protéine pouvaient être impliquées dans les remaniements structuraux du sarcomère consécutifs à la modulation du taux global de O-GlcNAcylation.

4. Des complexes multiprotéiques sont-ils modulés suite à la variation du taux de O-GlcNAcylation ?

4.1. Méthodologie choisie pour l'étude des complexes protéiques : la RN-PAGE.

Les complexes protéiques, régis par des interactions protéine-protéine étroitement régulées, sont intégrés aux différents processus cellulaires, du métabolisme à la structure. Comprendre les réseaux complexes d'interactions protéine-protéine est donc indispensable à la compréhension de certains mécanismes intracellulaires (Miernyk & Thelen, 2008). Il existe aujourd'hui différentes approches biochimiques destinées à caractériser des interactions protéine-protéine, listées dans le tableau IX.

Tableau IX : Avantages et inconvénients des différentes méthodes biochimiques pour la caractérisation des interactions protéine-protéine (d'après Miernyk & Thelen, 2008).

Méthode	Avantages	Inconvénients
Co-immuno-précipitation	Spécifique. Relativement simple. Compatible avec différentes méthodes d'analyse en aval. Possibilité de réutiliser les réactifs.	Parfois difficulté à obtenir des anticorps hautement spécifiques et avec une forte affinité. Faible capacité.
Blue Native PAGE (BN-PAGE)	Faible coût. Ne nécessite pas un équipement particulier. Compatible avec différentes méthodes d'analyse en aval.	Fonctionne mieux avec des protéines membranaires. Résolution assez faibles. Sensible à des solutés de bas poids moléculaire.
In vitro binding	Relativement simple. Compatible avec différentes méthodes d'analyse en aval.	Part importante de manipulation d'ADN recombinant nécessaire. Non adapté si les interactions sont médiées par une protéine « tiers ».
Cross-link chimique	Forte capacité. Stabilise les interactions protéine-protéine.	Complicite les analyses en aval. Interférences chimiques potentielles. Stabilise aussi des interactions non spécifiques.
Sédimentation zonale	Non destructrice. Compatible avec différentes méthodes d'analyse en aval. Reproductibilité importante.	Nécessite beaucoup de temps. Nécessite un équipement spécialisé.

Afin de déterminer si la variation du taux de O-GlcNAcylation jouait un rôle dans la modulation d'interactions protéine-protéine, nous avons entrepris l'analyse de complexes multiprotéiques par électrophorèse en conditions natives. Le principe général de méthode de « Blue-Native » PAGE est présenté figure 87 (Schamel, 2008). Aucun agent dénaturant n'est présent, les protéines étant solubilisées dans des détergents doux non-ioniques de type Triton X-100, digitonine, CHAP, dodécylmaltoside... en remplacement du SDS, détergent ionique fort généralement utilisé pour la solubilisation et la dénaturation des protéines en SDS-PAGE. Dans le cas du BN-PAGE, les échantillons sont incubés en présence de bleu de Coomassie G-250, colorant chargé négativement se fixant en surface des protéines, facilitant ainsi la séparation électrophorétique des complexes protéiques. Tandis que la BN-PAGE monodimensionnelle peut être utilisée directement pour visualiser des interactions protéiques, la méthode est plus résolutive lorsqu'elle est combinée à une seconde séparation : c'est la 2D-BN-PAGE, dans laquelle la première dimension est une BN-PAGE classique, tandis que la seconde dimension est une SDS-PAGE.

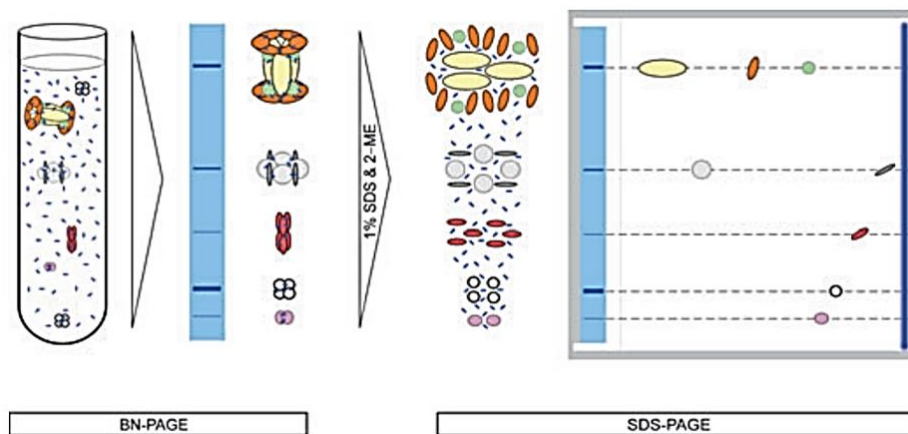


Figure 87 : Analyse des complexes multiprotéiques par électrophorèse en conditions non dénaturantes, ou native-PAGE. Principe général de la Blue-native PAGE (BN-PAGE) monodimensionnelle et bidimensionnelle. (d'après Miernyk & Thelen, 2008).

Des nombreuses étapes d'optimisation ont été nécessaires afin d'adapter la technique d'électrophorèse non dénaturante à l'analyse d'extrait de cellules musculaires (extrait protéique, conditions de séparation, tampon d'électrophorèse...). Dans certains cas, le bleu de Coomassie G-250 est remplacé par du rouge Ponceau S (Drab et al., 2011a ; Drab et al., 2011b) : c'est la RN-PAGE (Red-Native PAGE) ; cette approche méthodologique est plus adaptée à la séparation d'extrait de cellules musculaires.

4.2. Modulation des complexes multiprotéiques dans les myotubes C2C12 lors de la variation du taux de O-GlcNAcylation.

Nous avons donc appliqué la méthodologie décrite dans le paragraphe précédent à des grands gels électrophorétique afin de visualiser si des complexes protéiques étaient modifiés consécutivement à la variation des taux de O-GlcNAcylation des myotubes en culture. En

effet, s'il y a une différence dans le profil protéique (intensité de bandes et/ou de migration électrophorétique), la cause serait directement liée à un changement des interactions protéine-protéine suite à la modulation du taux de O-GlcNAcylation, et donc potentiellement dépendante de la O-GlcNAcylation. Nous avons analysé des extraits protéiques de myotubes C2C12 traités par le Thiamet G ou le DON aux différentes concentrations. Après migration et coloration du gel au bleu colloïdal, nous avons observé des variations de profils protéiques entre les différentes conditions expérimentales (figure 88), notamment des zones (numérotées sur la figure 88) où les différences de migration sont notables, et ce de manière dose-dépendante. Ces résultats nous laissent penser à des changements dans les complexes protéiques, liés à une modulation des interactions protéine-protéine. Ces bandes protéiques différentielles ont été découpées puis digérées par la trypsine. Les protéines constitutives de ces complexes sont identifiées par spectrométrie de masse de type Nano-LC MS/MS ; dans le tableau X sont indiquées les protéines structurales identifiées dans cette analyse, pouvant potentiellement être impliquées dans les remaniements structuraux de sarcomère consécutifs aux changements du taux global de O-GlcNAcylation.

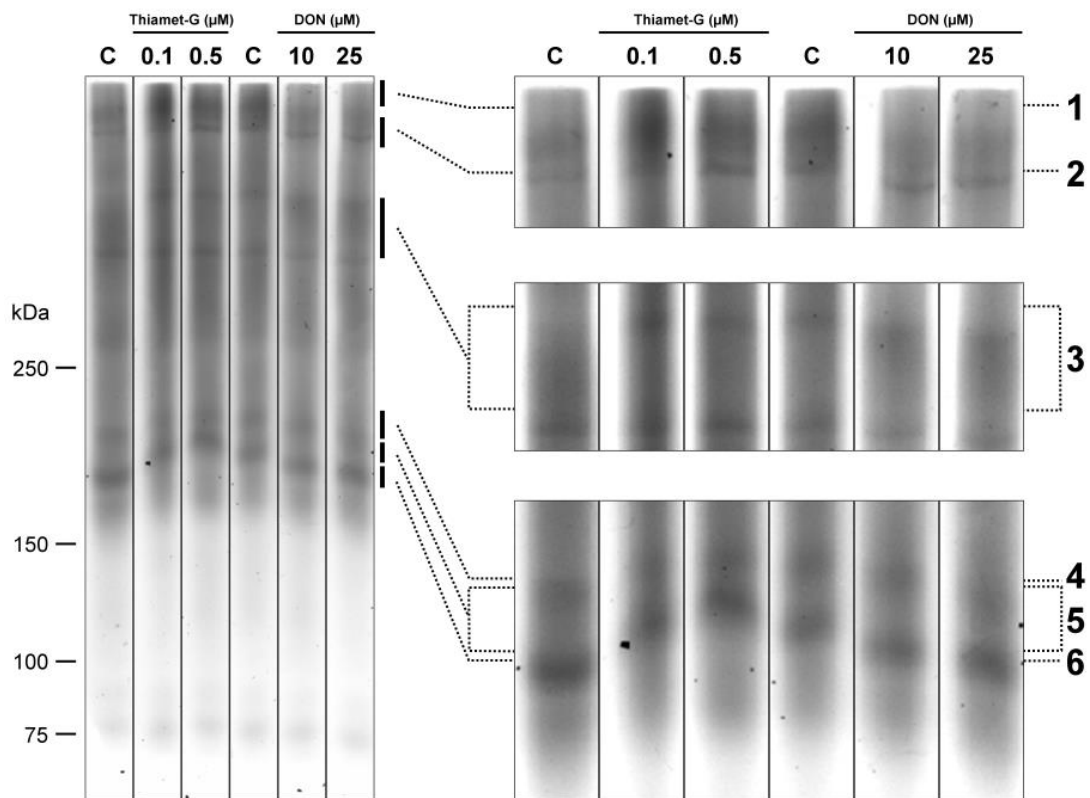


Figure 88 : Profils protéiques d'extraits natifs de myotubes C2C12 non traités, ou traités par du DON ou du thiamet G, séparés par Red-native PAGE. Ce gel natif a une réticulation de 5% en, et est coloré au bleu colloïdal. Les bandes différentielles ont été découpées du gel ; les protéines constitutives de ces complexes ont été identifiées par spectrométrie de masse.

Il est important ici de souligner que de nombreuses autres protéines ont été identifiées dans cette étude, notamment :

- d'autres protéines de structurales telles que la vinculine, la tubuline β , l'actine cytoplasmique, la gelsoline... ;

- des protéines chaperonnes, telles que les HSP90 (α et β), ou l'HSC71 ;
- des enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique (phosphoglycerate kinase, triose phosphate isomérase, phosphoglycerate kinase...)
- des protéines impliquées dans les processus de dégradation, par exemple des ubiquitin-activating enzyme.

Parmi toutes les protéines identifiées, certaines protéines sont de très bons candidats pour expliquer les remaniements structuraux consécutifs aux changements de O-GlcNAcylation. Ces protéines clés structurales, myofilamentaires, et indiquées dans le tableau X, sont la filamine C, la moesine, l' α B-cristalline, la desmine, et l' α -actinine.

Tableau X : Protéines sarcomériques structurales faisant partie de complexes protéiques modulés suite à la variation du taux global de O-GlcNAcylation, et identifiées par spectrométrie de masse.

Protein name	Accession no. (UniProtKB)	Predicted MW (kDa)	Sequence coverage (%)	No. of identified peptides	Mascot score	Band
Filamin-C	Q8VHX6	290.9	22,1	36	3268.1	1-2
Moesin	P26041	67.7	11,6	6	549.6	1-3
Alpha-crystallin B chain	P05811	20.1	28,6	4	304.6	1-2-3
Desmin	P31001	53.5	21,1	5	302.3	1-2-3
Alpha-actinin-1	Q7TPR4	103	13,7	3	151.2	3

De manière intéressante, toutes ces protéines, à l'exception de la moésine, sont O-GlcNAcylées. Nous avons quantifié la variation d'expression de ces protéines, et seule la moésine présente une augmentation d'expression lors des traitements au DON (et donc lors de la diminution du taux global de O-GlcNAcylation), tandis que son expression est augmentée lors des traitements du Thiamet G (et donc à l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation). Nous avons également fait des western blot en conditions natives, et mis en évidence que la quantité de certaines protéines au sein de complexes multiprotéiques était modifiée, notamment l' α -actinine et la moésine, tandis que la filamine C ne l'est pas. En revanche, pour l'un des complexes protéiques, nous avons observé une superposition des signaux pour la desmine et l' α B-cristalline, et, de manière intéressante, une modulation de la quantité de ces deux protéines.

5. Discussion générale et perspectives.

5.1. Protéines structurales constitutives des complexes protéiques modulés suite à la variation du taux de O-GlcNAcylation.

5.1.1. α -actinine et moésine.

L'une des protéines identifiées dans notre étude, et potentiellement impliquée dans les remaniements structuraux du sarcomère est l' α -actinine. D'après notre analyse par RN-PAGE et western blot, il semblerait que certaines interactions impliquant l' α -actinine soient

modulées. Composant majeur de la strie Z, cette protéine est fondamentale pour l'organisation sarcomérique (Sjoblom et al., 2008). En effet, l' α -actinine joue un rôle essentiel pour l'équilibre du sarcomère en ce sens qu'elle sert de « plateforme » pour de multiples interactions protéine-protéine avec des protéines cytosquelettiques et régulatrices. Ainsi, l' α -actinine lie l'actine sarcomérique, et la connecte à diverses voies de signalisation intracellulaires (Ribeiro, Jr. et al., 2014).

De manière intéressante, la moésine intervient aussi dans ces deux mécanismes. Cette protéine du cytosquelette change sa conformation pour associer le sarcomère au sarcolemme. Par exemple, après la phosphorylation de la thréonine 558, la moésine change de conformation, conduisant à sa fixation à l'actine F pour activer d'autres partenaires protéiques (Huang et al., 1999). Par ailleurs, si la structure de la moésine est « anormale », elle sera principalement localisée à la membrane, augmentant la polymérisation de l'actine (ce qui peut être impliqué dans des cardiomyopathies), et la voie RhoA/ROCK sera altérée, conduisant aux complications du diabète (Huang, 2012).

5.1.2. Desmine et α B-cristalline.

La desmine est aussi un composant des complexes modulés lors de la variation du taux global de O-GlcNAcylation des myotubes C2C12. Principalement localisée au niveau de la strie Z et de la ligne M, la desmine est une protéine des filaments intermédiaires essentielle pour l'intégrité structurale du sarcomère (Paulin & Li, 2004). Elle permet l'ancrage des myofibrilles au sarcolemme mais aussi à d'autres éléments cellulaires tels que les noyaux et les mitochondries (figure 89), constituant un véritable réseau tridimensionnel (Capetanaki et al., 2007). Les filaments intermédiaires de desmine entourent les myofibrilles de telle sorte à aligner les disques Z. Elle permet également l'association de différents complexes multiprotéiques avec l'appareil contractile ; ce lien permet l'intégration et la coordination des besoins de la cellule musculaire lors de la transmission de force, pour la production de l'énergie et la croissance de la cellule.

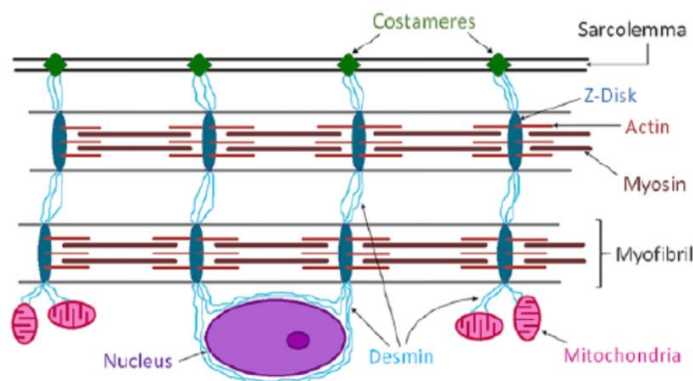


Figure 89 : Représentation du réseau de filament intermédiaire de desmine. Notez l'association des myofibrilles, avec le sarcolemme, les noyaux et les mitochondries par l'intermédiaire de la desmine. (d'après Koutakis et al., 2015).

La desmine occupe donc un rôle majeur dans la cytoarchitecture de la cellule musculaire, en ce sens qu'elle possède un très vaste interactome (Costa et al., 2004 ; Hnia et al., 2015 ; Winter et al., 2014), fondamental quant au maintien de la structure sarcomérique (Capetanaki et al., 2015). En effet, elle interagit de façon dynamique (Herrmann & Aebi,

2000) avec de nombreuses protéines myofibrillaires, des protéines chaperonnes, des protéines de signalisation ou encore des protéines des systèmes de dégradation. Par ailleurs, la desmine est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles dont l'ubiquitination, la phosphorylation et/ou la O-GlcNAcylation par exemple (Snider & Omary, 2014 ; Winter et al., 2014). Cependant, bien que la phosphorylation de la desmine module son état de polymérisation, aucune donnée ne montre à ce jour que ces modifications post-traductionnelles puissent avoir un impact sur l'interactome dépendant de la desmine. En effet, il a été démontré que son degré de polymérisation est dépendant de son état de phosphorylation (Sihag et al., 2007), mais pourrait aussi potentiellement dépendre du taux de O-GlcNAcylation puisqu'il a été démontré que la polymérisation des cytokératines 8 et 18 (Srikanth et al., 2010) ou de la tubuline (Ji et al., 2011) est modifié par la O-GlcNAcylation.

Par ailleurs, l'intégrité des filaments de desmine et la formation de son réseau peuvent également être régulées par des protéines de choc thermique, notamment par le biais de modifications post-traductionnelles. Ainsi, il a été démontré que des modifications de certains de ses partenaires, tels que l'HSP25 ou l' α B-cristalline, jouaient un rôle significatif dans la localisation et la stabilisation de la desmine. En effet, la phosphorylation de l'HSP25 sur la Ser15 semble modifier la localisation de la desmine à la ligne Z et sa colocalisation avec l' α -actinine (Kawano et al., 2012). Il a également été montré que les interactions entre l' α B-cristalline et les filaments de desmine jouaient un rôle crucial dans son agrégation et sa localisation (Elliott et al., 2013), notamment selon sa phosphorylation de l' α B-cristalline (Eaton et al., 2001). La O-GlcNAcylation de cette petite protéine de choc thermique joue sur sa translocation et la stabilisation des éléments du cytosquelette (Krishnamoorthy et al., 2013). De façon intéressante, la desmine possède des propriétés lectiniques vis-à-vis de la O-GlcNAcylation (Ise et al., 2010). Or, nos travaux ont mis en évidence que la modulation du taux global de O-GlcNAcylation conduisait à des changements d'interactions entre la desmine et l' α B-cristalline.

5.2. Perspectives.

Afin de finaliser ces données, nous envisageons de caractériser, grâce à une approche « *sans a priori* », les protéines myofilamentaires présentant une modulation de leur taux de O-GlcNAcylation, et/ou de phosphorylation et/ou d'expression totale suite aux traitements pharmacologiques effectués sur les cellules C2C12. Le but est *in fine* de corréliser les variations de O-GlcNAcylation avec les changements structuraux observés par immunofluorescence. La stratégie expérimentale sera l'analyse protéomique différentielle, basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle, que nous avons précédemment détaillé, dans le chapitre « O-GlcNAcylation, protéomique et développements méthodologiques ». Comme nous l'avons vu, les protéines O-GlcNAcylées seront marquées par l'Alexa Fluor 488 grâce au marquage spécifique du motif O-GlcNAc par l'azido-galactosamine, puis au couplage avec le fluorophore. Le phosphoprotéome sera visualisé par coloration au ProQ Diamond, tandis que le protéome myofilamentaire sera détecté par fluorescence, après marquage des protéines avec le fluorophore T-Red 310.

Nous envisageons également de localiser les sites de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires grâce à la méthodologie de Click Chemistry, également décrite dans le chapitre « O-GlcNAcylation, protéomique et développements méthodologiques », ce qui nous permettra de déterminer si des sites modifiées par le motif O-GlcNAc sont localisés dans des domaines d'interaction protéine-protéine.

Les perspectives décrites ci-dessus sont des perspectives à court terme, qui permettrait de finaliser l'ensemble des résultats décrits dans ce chapitre « O-GlcNAcylation et structuration sarcomérique ». Je souhaite également développer un projet à plus long terme en me focalisant plus spécifiquement sur l'interactome dépendant de la desmine, et notamment déterminer dans quelle mesure les variations de O-GlcNAcylation peuvent moduler son interactome. J'envisage également une étude plus ciblée sur l'interaction desmine- α B-cristalline, et notamment déterminer si des changements de leur taux de phosphorylation et/ou de O-GlcNAcylation peuvent moduler leur interaction. Je détaillerai plus spécifiquement ces perspectives dans la partie de ce mémoire consacrée aux futurs projets de recherche.

Projet de recherche

Projet de recherche

Comme nous l'avons vu dans ce mémoire, mes travaux de recherche ont porté sur la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation dans la physiologie et la plasticité du muscle squelettique, et se sont notamment articulés autour des thématiques suivantes : (i) la modulation de l'activité contractile, notamment au travers des propriétés d'activation calcique ; (ii) la cytoarchitecture sarcomérique ; (iii) l'homéostasie protéique, avec plus spécifiquement un focus sur la synthèse protéique dépendante de la signalisation à l'IGF-1.

A cours des années à venir, j'envisage de poursuivre mon activité de recherche en me focalisant sur deux thématiques majeures que j'ai engagées et développées depuis mon recrutement au laboratoire. De plus, forte de divers développements méthodologiques mis en place au laboratoire, la protéomique jouera un rôle essentiel dans l'avancée de mes projets futurs. Les thématiques que je souhaite poursuivre ou développer au laboratoire sont les suivantes :

- **l'organisation et la réorganisation du sarcomère lors de la physiologie et la physiopathologie du muscle squelettique.** Mon projet est de caractériser précisément le rôle exercé par la O-GlcNAcylation dans la modulation de la cytoarchitecture sarcomérique grâce à une analyse protéomique différentielle, à la fois au niveau global, mais également au niveau d'une protéine centrale à l'architecture du muscle squelettique : la desmine. Une partie du projet sera focalisée sur la caractérisation de l'interaction entre la desmine et son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline (thème 1). J'envisage également de déterminer si la O-GlcNAcylation peut avoir des effets bénéfiques ou au contraire délétères dans un modèle animal de desminopathie (thème 2) ;
- **la protéostasie, ou homéostasie protéique.** Je souhaite en particulier finaliser certains travaux encore en cours au laboratoire concernant le rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la synthèse protéique ; en particulier, j'envisage de poursuivre l'étude de la O-GlcNAcylation dans la modulation des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régulation de la masse du muscle. Je caractériserai également le rôle de la O-GlcNAcylation dans la dégradation des protéines myofibrillaires, en grande partie responsable de la perte de fonction du muscle lors de l'atrophie (thème 3).

1. Thème 1 : O-GlcNAcylation, protéines structurales & interactome.

1.1. Focus sur la cytoarchitecture sarcomérique.

1.1.1. Background.

Alors qu'il est bien établi que la régulation des interactions protéine-protéine est en grande partie régulée par la phosphorylation, le rôle de la O-GlcNAcylation dans l'organisation structurale du sarcomère est encore mal comprise. Toutefois, des données récentes obtenues au laboratoire, dans la cadre de la thèse de Matthias LAMBERT et du Master 2 d'Amandine GIRARD, ont mis en évidence que la O-GlcNAcylation pourrait être tout aussi importante que la phosphorylation dans la structuration du sarcomère. En effet, pour supporter cette hypothèse, nous avons récemment démontré que l'OGT et l'OGA, les deux enzymes du processus de O-GlcNAcylation, sont localisées au niveau de la strie Z, véritable point nodal pour l'homéostasie du sarcomère (Cieniewski-Bernard et al., 2014b), et que de très nombreuses protéines impliquées dans l'ultrastructure du muscle squelettique sont O-GlcNAcylées, comme nous l'avons vu dans le Chapitre IV de mes travaux personnels (« O-GlcNAcylation & structuration sarcomérique. »), au paragraphe 1.3. « O-GlcNAcylation et protéines structurales ». De plus, nous avons récemment démontré que la O-GlcNAcylation est un modulateur clé de l'organisation sarcomérique, puisque la morphométrie du sarcomère (longueur du sarcomère et de la ligne M, largeur des bandes A et I) est directement corrélée au taux de O-GlcNAcylation des protéines myofibrillaires de cellules C2C12 différenciées en myotubes (Lambert et al., 2015a ; Lambert et al., 2015b). Nous avons mis en évidence que des complexes multiprotéiques étaient modulés consécutivement à la variation du taux de O-GlcNAcylation ; des protéines clés structurales ; des protéines structurales clés, notamment la desmine, la filamine C et l' α B-cristalline (qui sont d'ailleurs toutes O-GlcNAcylées), sont constitutives de ces complexes modulés. Il est important de souligner que certaines mutations de ces protéines résulte en une déstructuration marquée du sarcomère et de la myofibrille, et sont à l'origine de myopathies particulières : les myopathies myofibrillaires.

Cependant, le rôle précis de la O-GlcNAcylation dans l'organisation sarcomérique et son remodelage n'est pas encore précisément défini. En effet, la modulation de ces complexes protéiques pourrait résulter d'une régulation des interactions protéines-protéines, de modulation de l'état de phosphorylation, mais également d'un turn-over différentiel des protéines constitutives de ces complexes, puisque des protéines impliquées dans les processus de dégradation (calpaïnes et protéines du système ubiquitine-protéasome) sont localisées au niveau du sarcomère. Ainsi, on ne sait pas encore si les interactions protéine-protéine impliquées dans l'organisation semi-cristalline du sarcomère sont directement dépendantes du motif GlcNAc, et/ou si la O-GlcNAcylation est impliquée dans l'homéostasie des protéines structurales.

1.1.2. Objectifs et choix méthodologiques.

L'objectif du premier thème de mon projet de recherche est donc de caractériser précisément le rôle exercé par la O-GlcNAcylation dans l'organisation et la réorganisation du sarcomère. Ces travaux seront effectués sur des myotubes C2C12 dont le taux global de O-

GlcNAcylation sera modulé par des agents pharmacologiques : le Thiamet G, inhibiteur de l'OGA utilisé en routine au laboratoire (Macauley & Vocadlo, 2009), et le l'Ac₄-5SGlcNAc, inhibiteur de l'OGT (Gloster et al., 2011). L'Ac₄-5SGlcNAc, provenant de l'équipe du Pr David VOCADLO (Simon Fraser University, Burnaby, Canada), est disponible au laboratoire ; cependant, cet inhibiteur n'a pas encore été appliqué aux myotubes C2C12, et nécessitera une optimisation des conditions de son application. Comme nous l'avons fait pour l'OGA, le taux global de O-GlcNAcylation sera déterminé par western blot, de même que l'activité de l'OGT et son activité. L'activité et l'expression de l'OGA seront également investiguées. Afin de déterminer si l'Ac₄-5SGlcNAc modifie ou non l'état de différenciation cellulaire, l'index de fusion (rapport entre le nombre de noyaux inclus dans un myotube [au minimum 2 noyaux] et le nombre total de noyaux) seront mesurés.

Afin de mieux caractériser le lien étroit entre la O-GlcNAcylation et la morphométrie du sarcomère, j'envisage de répondre aux questions suivantes :

- 1) Quelles sont les protéines myofilamentaires présentant une variation de leur taux de O-GlcNAcylation, et/ou de phosphorylation, et/ou d'expression totale (et donc potentiellement impliquées dans les remaniements structuraux du sarcomère consécutifs à la variation de O-GlcNAcylation des protéines myofilamentaires) ?
- 2) Quels sont les sites de O-GlcNAcylation au niveau des protéines myofilamentaires ? Les sites de O-GlcNAcylation sont-ils localisés dans les domaines connus d'interaction protéine-protéine ?
- 3) Si une protéine d'intérêt est modifiée par de multiples sites de O-GlcNAcylation (voire également de phosphorylation), comment quantifier la variation de O-GlcNAcylation *per site* ?
- 4) Quelles sont les répercussions structurales de la mutation de site(s) O-GlcNAcylé(s) au niveau de protéines d'intérêt identifiées lors de l'analyse protéomique différentielle du O-GlcNAcome ?

1.1.3. Analyse protéomique différentielle « en gel ».

Nous avons démontré que la morphométrie du sarcomère était corrélée au taux global de O-GlcNAcylation des protéines myofibrillaires ; cependant, nous n'avons identifié aucune protéine présentant une modulation de son taux de O-GlcNAcylation. Nous envisageons une stratégie d'analyse protéomique sans *a priori* afin d'identifier les protéines présentant une modulation de leur expression et/ou de modifications post-traductionnelles d'intérêt, à savoir la phosphorylation et la O-GlcNAcylation, et donc potentiellement impliqués dans les remaniements structuraux des myotubes traités de manière à faire varier le taux de O-GlcNAcylation. Nous appliquerons donc la méthodologie mise en place récemment au laboratoire (Cieniewski-Bernard et al., 2014a), décrite au paragraphe 4.2. « Détection du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome global à partir d'un seul et même gel », au chapitre I de mes travaux personnels (« O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques »).

Dans notre contexte biologique, la problématique majeure de cette approche protéomique différentielle ne concerne pas la méthode en tant que telle, mais l'échantillon

biologique. Les protéines myofilamentaires sont assez difficiles à solubiliser, et les premiers essais de séparation électrophorétique ont été peu concluants (figure 90A). En effet, de par la faible résolution des spots protéiques, particulièrement marquée pour les protéines de haut poids moléculaire, il n'était pas envisageable de réaliser une analyse d'image. Nous avons donc optimisé différents paramètres afin d'améliorer la séparation électrophorétique, notamment le tampon de solubilisation des échantillons, l'isoélectrofocalisation, ainsi que les conditions de seconde dimension. Afin d'améliorer la solubilisation de l'échantillon, nous avons testé différents agents chaotropiques, détergents non ionique et/ou zwitterionique, un agent réducteur, et ampholytes (Adessi et al., 1997 ; Martins-de-Souza et al., 2007 ; Rabilloud et al., 1997 ; Rabilloud, 2009 ; Weiss & Gorg, 2008). Nous avons également modifié différents paramètres de l'isoélectrofocalisation, incluant également l'étape de réhydratation des strips d'IEF (Immobilin Dry strip). Enfin, la séparation électrophorétique en seconde dimension (SDS-PAGE) a également été améliorée, en jouant notamment sur les tampons de migration (pH du tampon de migration, taurine ou tricine, comparativement à la glycine ; tampons anodique et cathodique différents) (Tastet et al., 2003). La séparation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines myofilamentaires a été optimisée, comme nous pouvons l'observer figure 90B (voir encart), ainsi que le protocole de coloration au ProQ Diamond (Sasse & Gallagher, 2009), et le marquage des protéines par le T-Red 310 (extrait total de protéines myofilamentaires) ou par l'Alexa Fluor 488 pour les protéines O-GlcNAcylées.

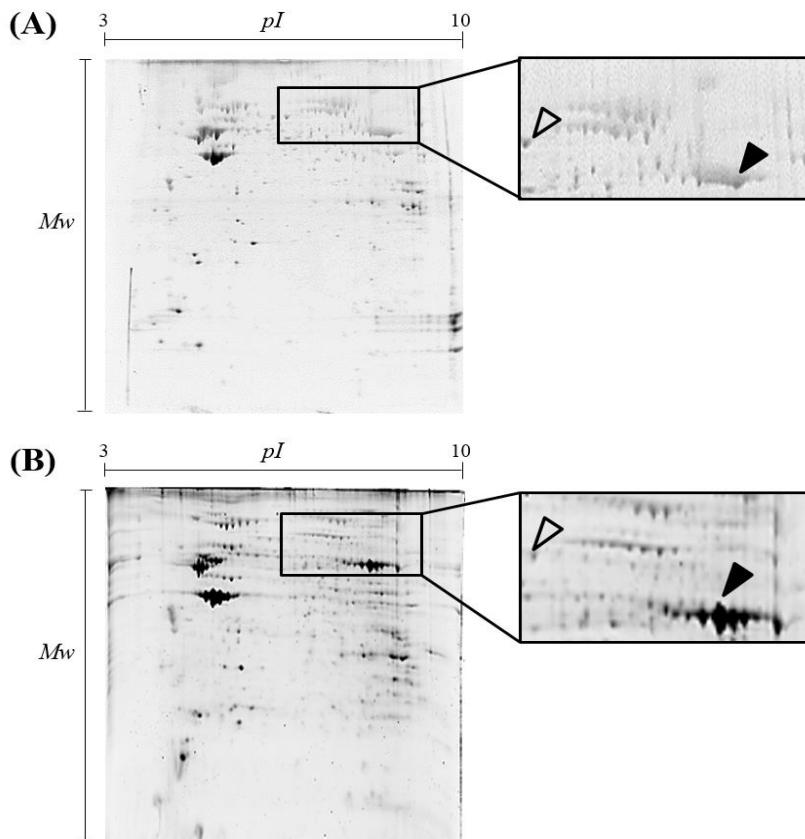


Figure 90 : Séparation de protéines myofilamentaires extraites de cellules C2C12 par électrophorèse bi-dimensionnelle. Gels bidimensionnels colorés au nitrate d'argent permettant la séparation de protéines myofilamentaires avant (A) ou après (B) optimisation des conditions de solubilisation de l'échantillon et de séparation électrophorétique. L'IEF a été effectuée sur des Immobilin Dry strip de 18 cm, sur une gamme de pH de 3 à 10, et la seconde dimension sur un gel SDS-PAGE à 10% en acrylamide.

Nous avons ainsi établi toutes les conditions expérimentales permettant de finaliser l'identification des protéines modulées en termes d'expression, de O-GlcNAcylation et/ou de phosphorylation des protéines myofilamentaires extraites de myotubes C2C12. Les extraits issus de myotubes traités ou non par le Thiamet G pourront ainsi être analysés par le logiciel d'analyse d'images SameSpots (Nonlinear Dynamics). L'intérêt majeur de cette approche sera l'obtention de trois informations (O-GlcNAcylation, phosphorylation et expression totale) en un seul gel. Une fois les spots différentiels définis par l'analyse d'images, les protéines seront identifiées par spectrométrie de masse, et les résultats validés par western blot (précédés ou non d'immunoprécipitation).

1.1.4. Caractérisation des sites de O-GlcNAcylation.

L'approche expérimentale qui sera adoptée pour l'identification des sites de O-GlcNAcylation est basée sur une stratégie de Click chemistry, actuellement en place au laboratoire (Deracinois et al., 2015a). Cette stratégie expérimentale, récemment décrite dans la littérature (Hahne et al., 2013), sera appliquée sur une fraction protéique enrichie en protéines myofilamentaires. Cette méthodologie a été détaillée dans le chapitre I « O-GlcNAcylation, protéomique et développements méthodologiques », plus spécifiquement au paragraphe 5 « Identification des sites de O-GlcNAcylation ». Afin d'augmenter le nombre de sites identifiés, il est envisagé de fractionner l'extrait de protéines myofilamentaires, par exemple par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium (figure 91). Cette approche permet en particulier de détecter et de visualiser certaines protéines (comme celles indiquées par les flèches, figure 91), non observables dans l'extrait protéique total (0% de sulfate d'ammonium).

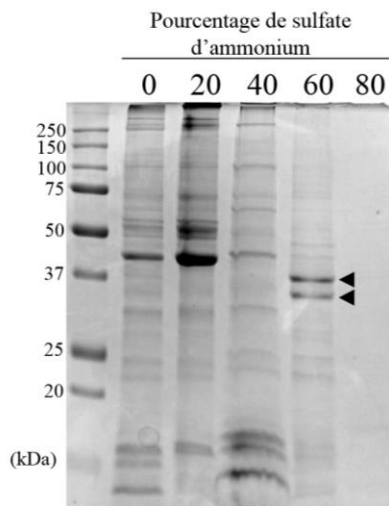


Figure 91 : Précipitation différentielle de protéines myofilamentaires. Un extrait de protéines myofilamentaires, extraites de myotubes C2C12, sont précipitées différenciellement par le sulfate d'ammonium (20, 40, 60 et 80% de sulfate d'ammonium). Notez les différences entre les profils protéiques obtenus selon la concentration de sulfate d'ammonium.

Chaque fraction sera soumise au protocole de Click chemistry. Ainsi, après les réactions de marquage et couplage, et la digestion trypsique sur billes, les peptides O-LacNAcylés libérés par β -élimination seront analysés par spectrométrie de masse en mode ETD (fragmentation par transfert d'électron) permettant de localiser précisément l'acide aminé porteur de la modification post-traductionnelle. L'analyse sera effectuée sur un

spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap dans le cadre de la Plateforme MaP-CRCM de Marseille (collaboration avec le Dr Luc CAMOIN, déjà en place avec notre équipe). Grâce aux banques de données protéiques, il sera alors possible de déterminer si des sites de O-GlcNAcylation sont localisés au sein de domaines d'interactions protéine-protéine, domaines aujourd'hui bien caractérisés sur un grand nombre de protéines, notamment les protéines structurales, ou bien correspondant à un site de phosphorylation par exemple.

1.1.5. Méthode de quantification des variations de O-GlcNAcylation *per site*.

L'identification des sites de O-GlcNAcylation, associée à l'analyse protéomique différentielle, permettra donc de proposer des protéines candidates impliquées dans les remaniements structuraux du sarcomère que nous avons observés lors de la variation du taux global de O-GlcNAcylation. Si cette première approche permet de quantifier la variation de O-GlcNAcylation au niveau d'une protéine, elle ne permet pas de quantifier la variation de O-GlcNAcylation site à site lorsqu'une protéine est modifiée par plusieurs sites de O-GlcNAcylation. Nous proposons de développer une méthode, basée sur le SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) et la Click chemistry, afin de quantifier la variation de O-GlcNAcylation *per site*.

En effet, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.3.2. « Quantification par spectrométrie de masse » (Chapitre I « O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques. »), le SILAC permet de quantifier l'abondance relative des protéines issues de deux lysats cellulaires, grâce à la comparaison entre un protéome « léger » et un protéome « lourd » (Ong, 2012). De par l'importance des modifications post-traductionnelles dans les systèmes biologiques, de nombreux groupes de recherche ont appliqué le SILAC pour la mesure des variations de modifications post-traductionnelles, et notamment la phosphorylation. Comme le SILAC permet le marquage des protéines *in cellulo*, donc avant la manipulation de l'échantillon, les étapes d'isolement subcellulaires et de fractionnement en aval ne sont pas modifiées, ce qui est un avantage certain pour l'analyse des modifications post-traductionnelles ; de plus, la quasi-totalité des peptides tryptiques est marquée grâce au SILAC. Ainsi, le SILAC a été appliqué dans le cadre de la phosphoprotéomique, à la fois au niveau de protéines ciblées (Park et al., 2006), de voies de signalisation cellulaire (Christensen et al., 2010 ; Hinsby et al., 2004), ou d'approche globale (Olsen & Mann, 2013 ; Rigbolt et al., 2011), la purification des phosphopeptides étant effectuée par chromatographie d'affinité (chromatographie de type IMAC [Immobilized Metal Affinity Chromatography] ou de TiO₂), ou à l'aide d'anticorps (notamment anti-phosphotyrosine). Cette approche protéomique a été plus récemment appliquée à d'autres modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation (Choudhary et al., 2009), l'ubiquitination (Wagner et al., 2012), ou encore la palmitoylation (Martin et al., 2012). Dans ce dernier cas, un double marquage a été effectué. D'une part, les protéomes issus de deux conditions de cultures cellulaires distinctes ont été marqués par SILAC ; d'autre part, un analogue de l'acide palmitique (le 17-ODYA, acide octadécynoïque) a été ajouté dans le milieu de culture pour être incorporé au niveau des protéines à la place de l'acide palmitique, permettant ainsi en aval une analyse protéomique (semi)-quantitative.

J'envisage donc de marquer les myotubes de type C2C12 par SILAC, mais également marquer les motifs O-GlcNAc par l'intermédiaire de la Click chemistry (voir figure 92). Deux approches méthodologiques de marquage des protéines O-GlcNAcylées sont possibles : (i) le marquage métabolique par la GlcNAz, ou (ii) le marquage enzymatique par l'intermédiaire de la Y289L-galactosyltransférase (les étapes de marquage sont indiquées en bleu sur la figure 92). Lorsque j'avais comparé les deux méthodes de marquage, mon choix s'était orienté vers le marquage enzymatique, notamment pour l'analyse d'un extrait total (paragraphe 4.2.2.2. « Comparaison du marquage métabolique et du marquage in vitro. » au chapitre I de mes travaux personnels). Cependant, notre intérêt porte ici sur une fraction protéique particulière et assez peu soluble : les protéines myofiliaimentaires. L'incorporation de la GlcNAz en même temps que les réactifs SILAC pourrait ici permettre de limiter le nombre d'étape de préparation des échantillons ; des tests préliminaires permettront de déterminer le meilleur protocole de double marquage. En aval, les peptides issus des protéines myofiliaimentaires « lourdes » et « légères », également marqués par une fonction azide, pourront être couplés à de la biotine afin de permettre leur purification sur billes de streptavidine, puis leur analyse par spectrométrie de masse (plateforme MaP-CRCM de Marseille, en collaboration avec le Dr Luc CAMOIN).

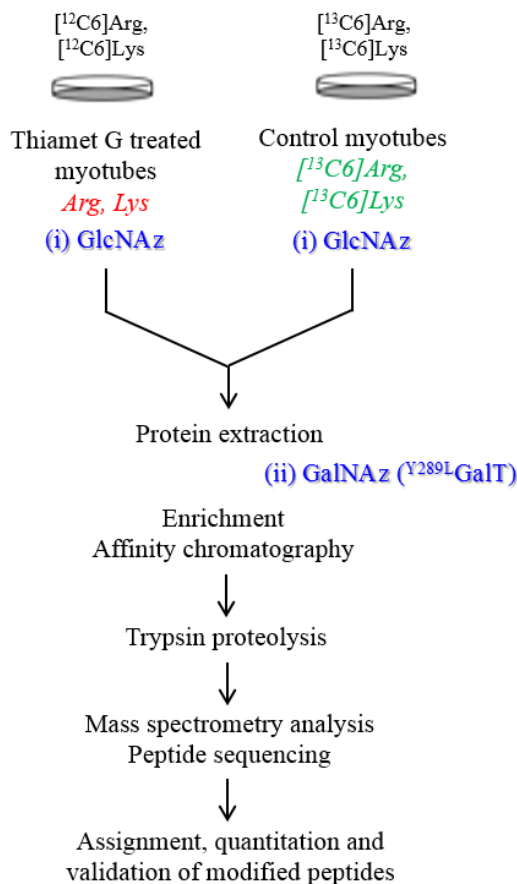
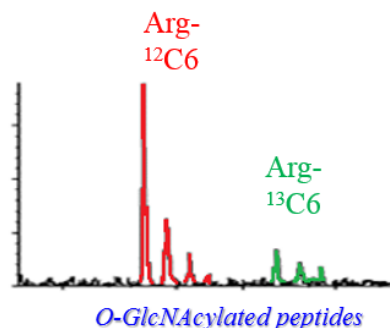


Figure 92 : Méthodologie pour la mesure de la variation de O-GlcNAcylation per site. Par le marquage SILAC, les protéomes « lourd » et « léger » pourront être comparés au niveau protéique ; l'incorporation d'une fonction azide au niveau du motif O-GlcNAcylé permettra une purification des peptides O-GlcNAcylés, et donc une quantification de la variation de O-GlcNAcylation entre les deux conditions expérimentales. (modifié d'après Hinsby et al., 2004).



1.1.6. Validation des données *in cellulo*.

La dernière étape de ce travail permettra d'appréhender, de façon directe, les répercussions structurales et fonctionnelles de la mutation de sites de O-GlcNAcylation au

niveau de protéines d'intérêt, *i.e.* celles présentant une modulation de leur taux de O-GlcNAcylation et identifiées par l'analyse protéomique différentielle. Ces sites de O-GlcNAcylation d'intérêt seront mutés par mutagenèse dirigée sur un modèle cellulaire de cellules musculaires de type C2C12, en collaboration avec le Dr Florence PINET (INSERM U1176, Lille) et le Pr Onnik AGBULUT (UMR 8256, Paris). L'effet de la mutation des sites de O-GlcNAcylation sur la morphométrie sarcomérique sera analysé par immunofluorescence après marquage des protéines sarcomériques, comme cela a été précédemment fait au laboratoire. Une approche par microscopie électronique sera également envisagée. L'acquisition des images par microscopie confocale et électronique sera effectuée en collaboration avec Elodie RICHARD et Anne-Sophie LACOSTE au Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire (plateforme GIS-IBISA BICel, Université de Lille 1). Si le site de O-GlcNAcylation est localisé dans un domaine d'interaction protéine-protéine, nous analyserons les changements d'interactions protéique par co-immunoprécipitation et western blot, afin de quantifier les changements d'interaction entre deux protéines partenaires. L'ensemble des résultats sera confirmé par la technique du PLA (Proximity Ligation Assay).

1.2. Analyse protéomique différentielle de l'interactome-dépendant de la desmine

1.2.1. Pourquoi la desmine ?

La desmine est une protéine des filaments intermédiaires spécifique du muscle, essentielle au maintien de la cytoarchitecture du muscle strié. En préservant l'intégrité du muscle, la desmine est fondamentale à l'activité contractile, *i.e.* le développement de la force et la résistance à l'étirement (Li et al., 1997). La desmine a de multiples partenaires protéiques, incluant des protéines sarcomériques et des protéines du cytosquelette, mais elle a aussi des interactions avec des protéines des systèmes de dégradation protéique (figure 93) (Hnia et al., 2015). Elle constitue un véritable réseau, extrêmement complexe, autour de la strie Z, permettant la connexion des myofibrilles au sarcolemme et l'ancrage des mitochondries et des noyaux (voir figure 89, p153) (Koutakis et al., 2015).

Lorsque la desmine est mutée (à ce jour, au moins 50 mutations sont décrites sur le gène de la desmine), son réseau est désorganisé, tandis que des agrégats contenant de la desmine vont s'accumuler au niveau de la myofibrille. Quelle que soit la mutation, toutes conduisent à une altération de l'assemblage du filament de desmine ainsi que des perturbations d'interactions entre la desmine et ses protéines partenaires (Joanne et al., 2011). Je détaillerai ci-après les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie des desminopathies, résultant de ces mutations de la desmine.

1.2.2. L'interactome dépendant de la desmine est-il modulé par la O-GlcNAcylation ?

La desmine possède de nombreux partenaires protéiques (Costa et al., 2004 ; Hnia et al., 2015 ; Winter et al., 2014) dont les interactions pourraient être dépendantes de la O-GlcNAcylation. En effet, il a été démontré que la desmine possédait des propriétés lectiniques

vis-à-vis du motif O-GlcNAc (Ise et al., 2010), tandis que de nombreux partenaires (figure 93) sont O-GlcNAcylés, notamment des :

- cytolinkers (plectines)
 - plectine (Deracinois et al., 2015a) ;
- chaperons et protéines adaptatrices :
 - α B-cristalline (Roquemore et al., 1996) ;
 - protéines 14-3-3 (Nandi et al., 2006 ; Sprung et al., 2005) ; nous avons identifié au laboratoire les isoformes ϵ , σ , δ/ζ , et γ comme O-GlcNAcylées (Deracinois et al., 2015a). Cependant, nous n'avons pas identifié la protéine YWHAQ, correspondant à la protéine 14-3-30 ;
- protéines de signalisation :
 - intersectine, protéine régulatrice positive de la voie PKB (Deracinois et al., 2015a) ;
 - protéines de la famille des S100A1 (S100A11, (Deracinois et al., 2015a), protéines possédant un domaine calcium-binding et impliquées dans la régulation calcium-dépendante de divers processus physiologiques en interagissant avec d'autres protéines (telles que des protéines contenant des domaines TPR), modulant leur activité ; d'autres protéines de la famille des S100A avaient préalablement été identifiées comme O-GlcNAcylées (S100A7, S100A8 et S100A9, (Teo et al., 2010) ;
- protéines associées au sarcomère et au cytosquelette :
 - protéine de la famille des nébulines : nebulin-related anchoring protein (Deracinois et al., 2015a), localisée au niveau de la jonction myotendineuse et impliquée dans la transmission de force des myofibrilles à la matrice extracellulaire ;
 - spectrines (Deracinois et al., 2015a ; Khidekel et al., 2004) ;
 - ankyrine, permettant le lien entre les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique (Deracinois et al., 2015a ; Vosseller et al., 2006) ;
 - desmoplakine (Chalkley et al., 2009 ; Deracinois et al., 2015a) ;
 - myoméline, permettant l'ancrage entre les filaments intermédiaires et les myofibrilles (Deracinois et al., 2015a) ;
 - dynéines ; nous avons identifié les chaînes lourdes de dynéines comme O-GlcNAcylées (Deracinois et al., 2015a ; Nandi et al., 2006). De manière intéressante, un défaut de cette protéine est la cause du phénotype « leg at odd angles », caractéristique des animaux présentant un positionnement anormal du corps, telle que la suspension par la queue (hindlimb unloading)
 - titine, protéines essentielle à l'élasticité du muscle squelettique (Deracinois et al., 2015a) ;
 - protéines de la famille des calponines ; nous avons plus particulièrement identifié la calponine 3 (Deracinois et al., 2015a), impliquées dans le développement du muscle squelettique (Tang et al., 2014) ;
- protéines de la protéolyse et impliquées dans certaines modifications post-traductionnelles des protéines :

- calpaïnes, parmi lesquelles la petite sous-unité 1, endopeptidase calcium-dépendante (Deracinois et al., 2015a) ;
- protéines du système ubiquitine/protéasome ; nous avons identifié différentes protéines appartenant au système ubiquitine/protéasome, telles que des E3 ubiquitine ligase, ubiquitin-associated protein, proteasomal ubiquitin receptor, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, ainsi que des sous-unités du protéasome (Deracinois et al., 2015a) ;
- caspases, notamment la caspase 3 (Deracinois et al., 2015a) ;
- protéines des filaments intermédiaires :
 - vimentine (Deracinois et al., 2015a ; Slawson et al., 2008 ; Wang et al., 2007) et nestine (Deracinois et al., 2015a) ;
 - famille des lamines (prélamines), impliquées dans le développement des cellules musculaires et la prolifération des cellules satellites, mais également dans le maintien du volume et de la force des muscles squelettiques (Deracinois et al., 2015a) ;
 - syncoiline, protéine jouant un rôle important dans le couplage du stress mécanique entre la myofibrille et l'extérieur de la fibre (Deracinois et al., 2015a).

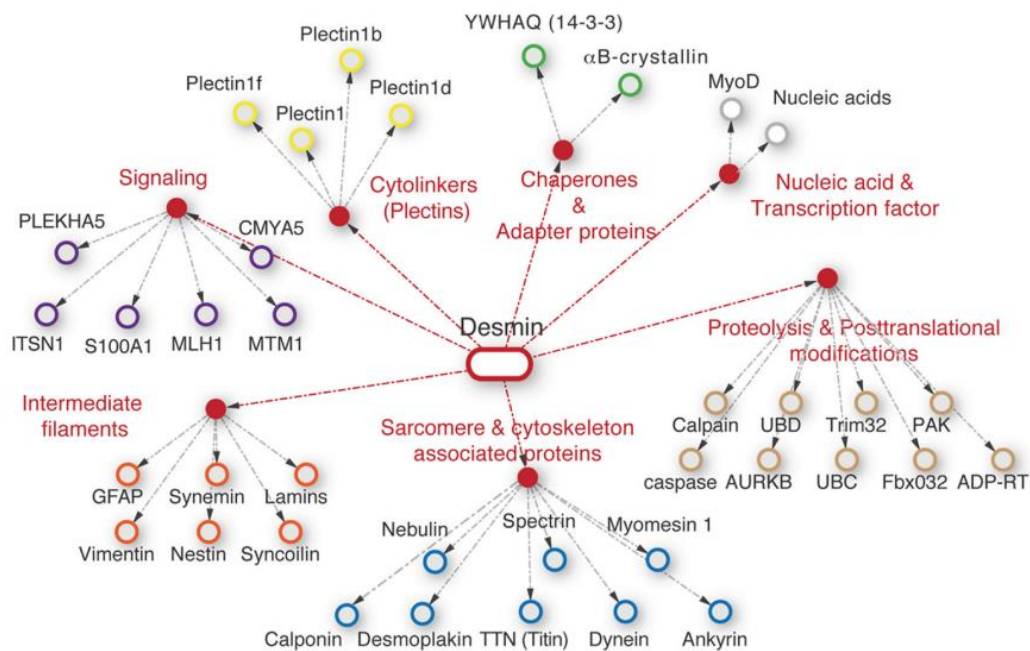


Figure 93: Interactome de la desmine. Cette carte d'interaction est basée sur des données publiées et des banques de données d'interactome (BioGrid, MINT, STRING). La desmine est considérée comme un véritable "organisateur" cellulaire de par son interaction avec de multiples partenaires protéiques tels que des chaperons, des protéines des voies de signalisation intracellulaire, des protéines sarcomériques et du cytosquelette, des protéines des filaments intermédiaires, etc... (d'après Hnia et al., 2015).

Nous avons démontré au laboratoire que la variation du taux global de O-GlcNAcylation conduisait à une modification de certains complexes multiprotéiques, certains

d'entre eux renfermant notamment des protéines structurales clé telles que la desmine (Lambert et al., 2015a). Par ailleurs, des expériences préliminaires concernant l'interactome dépendant de la desmine ont mis en évidence que cet interactome était modulé par l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation (figure 94).

Dans cette approche préliminaire, les protéines partenaires ont été co-immunoprécipitées avec la desmine, et séparées par électrophorèse monodimensionnelle. Ces travaux ont permis de montrer que certaines protéines co-immunoprécipitées avec la desmine et identifiées par spectrométrie de masse semblent être modulées lors de l'augmentation du taux de O-GlcNAcylation (figure 94). En particulier, certaines protéines du système ubiquitine-protéasome et des protéines de choc thermique semblaient être modulées au sein de cet interactome. Il me paraît donc indispensable de caractériser plus finement les modulations de l'interactome-dépendant de la desmine par une analyse protéomique différentielle. Deux approches expérimentales sont envisagées.

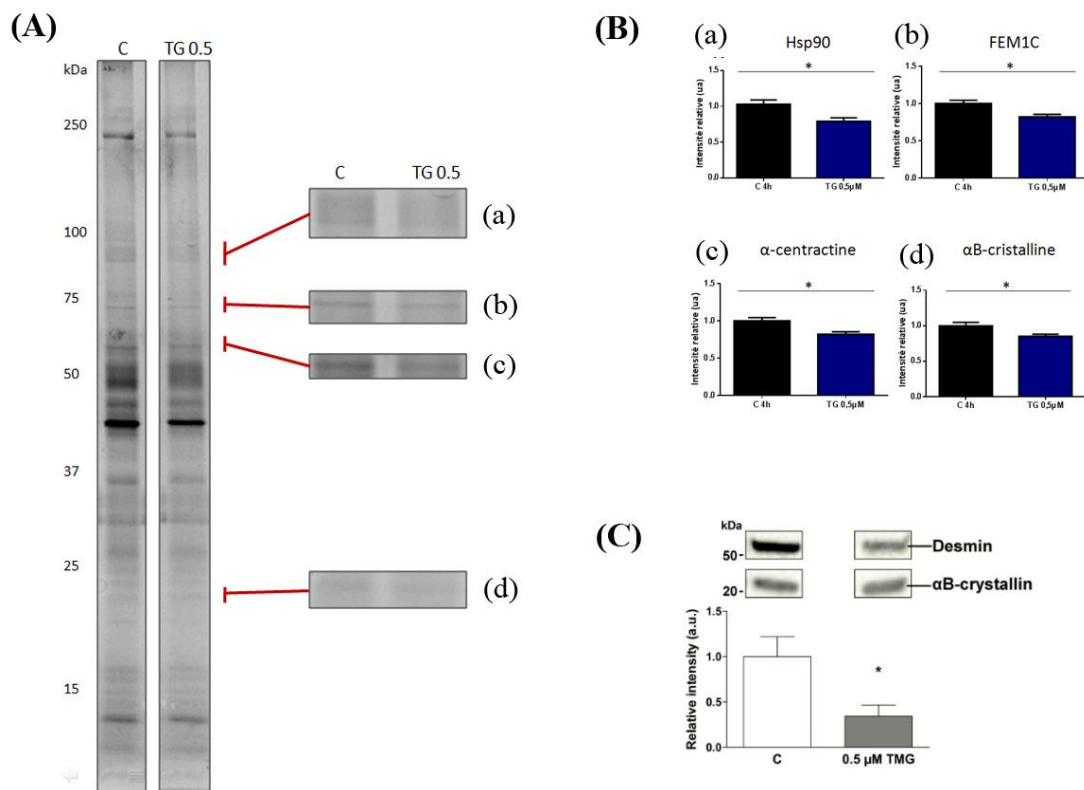


Figure 94 : Modulation des interactions entre la desmine et ses protéines partenaires. (A) La desmine, associée à ses partenaires protéiques, est précipitée, puis l'interactome de la desmine est séparée par électrophorèse monodimensionnelle. (B) Variation de l'intensité du signal pour certaines bandes protéiques, dont l'identité a été déterminée par spectrométrie de masse. (C) Co-immunoprécipitation de l'αB-cristalline et détection de la desmine par western blot.

Approche par 2-D DIGE (2-D Fluorescence Differential Gel Electrophoresis). Cette méthodologie permet de comparer aisément deux échantillons protéiques au sein d'un même gel, après leur marquage par fluorescence (voir paragraphe 1.3.1. « Approche par 2-DE (two-Dimensional gel Electrophoresis. » dans le chapitre I des travaux personnels). A partir de

myotubes C2C12 non traités ou traités de manière à modifier le taux global de O-GlcNAcylation, la desmine associée à ses partenaires protéiques sera immunoprécipitée, associée à ses partenaires protéiques. Une stratégie multiplex permettra la détection simultanée de plusieurs échantillons biologiques grâce au marquage par différents fluorophores, notamment l'interactome dépendant de la desmine isolé par co-immunoprécipitation à partir (i) de myotubes non traités, (ii) de myotubes traités au Thiamet G (c'est-à-dire dont le taux global de O-GlcNAcylation aura été augmenté), et (iii) de myotubes traités avec l'Ac₄-5SGlcNAc (c'est-à-dire dont le taux global de O-GlcNAcylation aura été diminué). L'analyse d'image sera effectuée par le logiciel SameSpots, et les spots protéiques différentiels seront identifiés par spectrométrie de masse, en collaboration avec le Dr Sophie DUBAN-DEWEER (Centre d'Analyse Protéomique de l'Artois, Université Jean Perrin, Lens). L'ensemble des résultats seront validés par des approches expérimentales de co-immunoprécipitation et de western blot, ainsi que par la technique d'*in situ* PLA (Proximity Ligation Assay), permettant de visualiser, après marquage par immunofluorescence de deux partenaires protéiques, leur degré d'interaction (Weibrecht et al., 2010). Les acquisitions par microscopie confocale seront effectuées en collaboration avec Elodie RICHARD (Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire, plateforme GIS-IBISA BICel, Université de Lille 1).

Approche par SILAC et AP-MS (Affinity Purification–Mass Spectrometry).

Aujourd'hui, avec les nombreux progrès en spectrométrie de masse, l'AP-MS couplée au SILAC est une méthode de choix pour quantifier la modulation des complexes protéiques, tels que l'interactome dépendant de la desmine (Boldt et al., 2014 ; Emmott & Goodfellow, 2014 ; Piechura et al., 2012). L'approche expérimentale est présentée figure 95.

Brièvement, les myotubes C2C12 seront traités par le Thiamet G ou l'Ac₄-5SGlcNAc afin de moduler le taux global de O-GlcNAcylation. Les protéines seront marquées *in cellulo* par SILAC. Cette méthode de protéomique quantitative est basée sur le marquage métabolique des protéines par des isotopes stables de la lysine et de l'arginine (isotopes lourds ¹³C₈-Lys and ¹³C₆¹⁵N₄-Arg). Après mélange des extraits protéiques et digestion trypsique, l'introduction de ces isotopes lourds résulte en une différence de masse prédictible entre les peptides non marqués et les peptides marqués (+8 et +10 unités de masse pour la lysine et l'arginine respectivement). Ces différences de masse permettent au spectromètre de masse de discriminer les deux formes de peptides issus de deux conditions expérimentales différentes au sein d'un même spectre (Filiou et al., 2012). Après avoir immunoprécipité la desmine, nous pourrions identifier les partenaires interagissant de manière différentielle avec la desmine lorsque le taux global de O-GlcNAcylation est modulé. Comme pour la méthode par gel bidimensionnel, les résultats devront être validés (co-immunoprécipitation et western blot ; PLA).

Il est à noter que cette partie de projet a été intégrée à un projet plus global soumis à une demande de financement à l'AFM-Téléthon, actuellement en cours d'évaluation (projet DES-GlcNAc, pour lequel je suis coordinatrice).

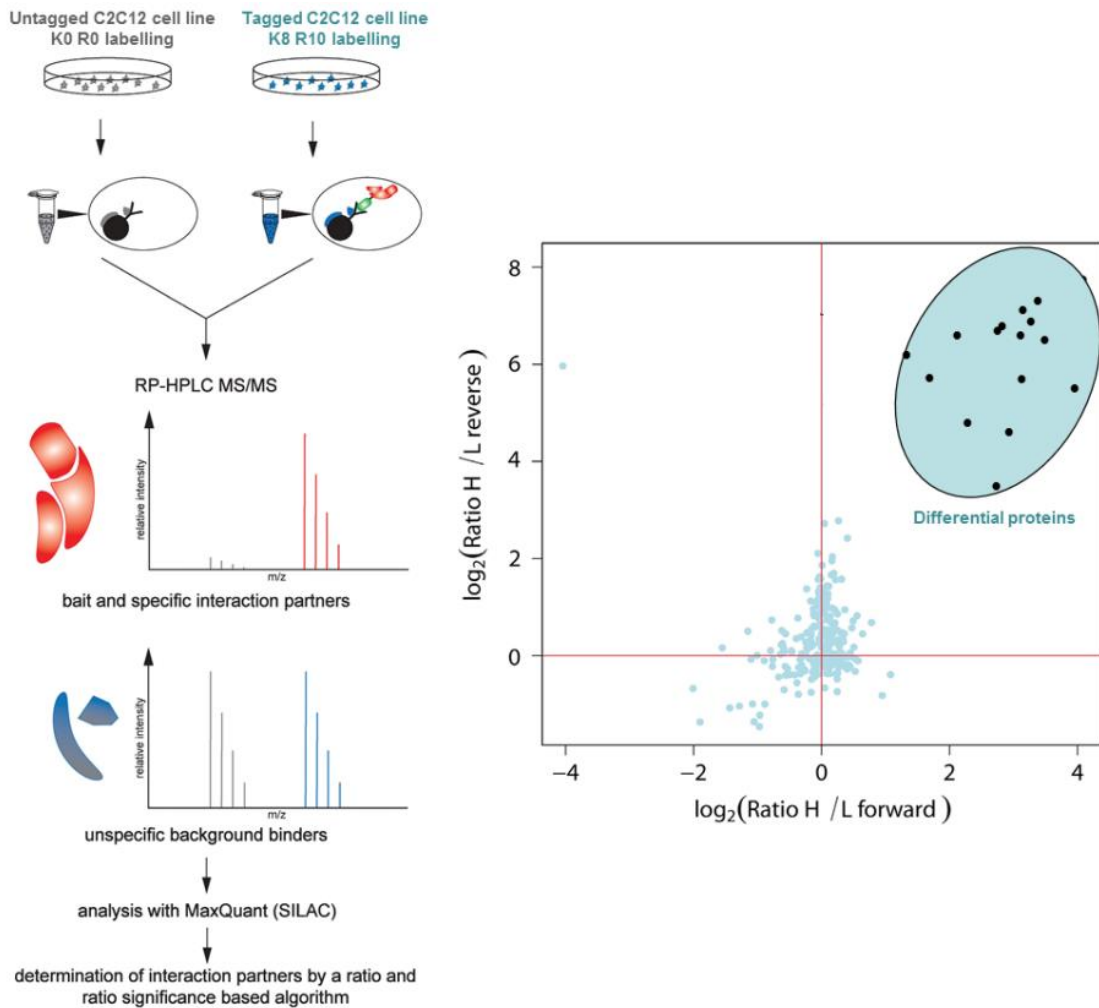


Figure 95 : Analyse protéomique différentielle de l'interactome de la desmine par une approche SILAC. Les cellules seront cultivées dans un milieu "léger" (K0R0) ou "lourd" (K8R10) selon les conditions expérimentales (i.e. traitées ou non pour moduler leur taux de O-GlcNAcylation). La desmine, associée à ses partenaires sera précipitée à partir des lysats cellulaires générés des deux conditions expérimentales, et mélangées selon un ratio 1 :1. Après digestion trypsique, les peptides sont séparés par RP-HPLC MS/MS et analysés par le logiciel MaxQuant. L'abondance de chaque forme de peptides sera déterminée par le ratio entre les peptides lourds et légers.

1.2.3. Focus sur l'interaction desmine- α B-cristalline.

L'objectif principal de ce projet de recherche est de mieux comprendre le rôle de la O-GlcNAcylation et de la phosphorylation dans la modulation des paramètres d'interaction entre la desmine et l' α B-cristalline. En effet, l'une des hypothèses de ce projet est que la O-GlcNAcylation pourrait moduler l'interaction entre la desmine et son chaperon moléculaire qu'est l' α B-cristalline. Nous allons donc déterminer si O-GlcNAcylation et/ou phosphorylation renforcent, ou au contraire abrogent, l'interaction entre la desmine et l' α B-cristalline. En effet, de nombreuses données présentent les petites protéines de choc thermique (sHSP, small Heat Shock Proteins) comme une « première ligne de défense », en particulier dans la prévention de l'agrégation irréversible des protéines dénaturées (Haslbeck & Vierling,

2015). En ce sens, un nouveau rôle de l' α B-cristalline en tant qu'agent thérapeutique a récemment émergé (Elliott et al., 2013 ; Houck et al., 2011 ; Reddy & Reddy, 2015). En effet, différents travaux ont conclu au potentiel thérapeutique de cette petite protéine chaperonne (Arrigo et al., 2007 ; Nagaraj et al., 2015 ; Reddy & Reddy, 2015). En particulier, de nombreuses données renforcent le rôle potentiel de l' α B-cristalline dans la protection contre la formation des agrégosomes et leur toxicité cellulaire (Chavez Zobel et al., 2003 ; Cox et al., 2014 ; Elliott et al., 2013 ; Hishiya et al., 2011 ; Kotter et al., 2014b). En effet, il a été démontré que l' α B-cristalline peut moduler l'agrégation de desmine anormale, mutée (Wang et al., 2003). Un autre exemple de renforcement d'interaction entre BAG3 et l' α B-cristalline supprime son agrégation et sa toxicité causé par une mutation de CRYAB (plus particulièrement dans les myopathies myofibrillaires). De manière intéressante, il a été montré que la phosphorylation de l' α B-cristalline affecte son activité de chaperon (Ecroyd et al., 2007).

Toujours à partir du modèle cellulaire de cellules C2C12 (myoblastes et myotubes), je déterminerai si la O-GlcNAcylation (et sa dynamique avec la phosphorylation) de la desmine et/ou de son chaperon moléculaire, l' α B-cristalline, peut moduler leur interaction. Les modifications post-traductionnelles de la desmine et/ou de ses partenaires n'ont jamais été considérées. Or, plusieurs données bibliographiques supportent la nécessité de comprendre comment les modifications post-traductionnelles régule l'interaction entre l' α B-cristalline et la desmine. De manière intéressante, il a été démontré qu'un mimétique de l' α B-cristalline phosphorylée module son activité de chaperon (Ecroyd et al., 2007) tandis que la O-GlcNAcylation régule sa translocation et la cytoprotection (Krishnamoorthy et al., 2013). L'un des mécanismes par lequel la O-GlcNAcylation régule les sHSP est une modulation de leur expression. Ainsi, l'augmentation de O-GlcNAcylation conduit à l'expression accrue de certaines protéines de choc thermique et inversement (pour revue, (Groves et al., 2013)). Il est à noter que parmi les chaperons dont l'expression est modulée par la O-GlcNAcylation, ont été identifiés HSP72, HSP40 J-domain containing proteins, l' α B-cristallin, HSP25, HSP90 ainsi que HSP60, de même que le régulateur Bag (Groves et al., 2013).

Afin de caractériser le rôle de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation dans l'interaction desmine- α B-cristalline, le taux de O-GlcNAcylation sera modulé au niveau de cellules musculaires de type C2C12. Nous quantifierons la variation de O-GlcNAcylation et de phosphorylation de la desmine et de l' α B-cristalline. Nous envisageons d'appliquer la même stratégie expérimentale que celle utilisée pour quantifier la variation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la MLC2s (Cieniewski-Bernard et al., 2014b) (voir chapitre II des travaux personnels : « O-GlcNAcylation, modulation de la contraction musculaire et MLC2. »). La variation de phosphorylation sera déterminée par western blot après séparation électrophorétique sur gel de Phos-tagTM acrylamide ; comme on peut l'observer sur la figure 96, il existe différentes formes de la desmine, distinguables selon le nombre de groupements phosphate.

Nous allons également quantifier la variation de O-GlcNAcylation de la desmine après immunoprécipitation des protéines O-GlcNAcylées, et détection par western blot ; si la séparation électrophorétique est effectuée sur gel de Phos-tagTM acrylamide, la variation de O-GlcNAcylation pourra être effectuée sur chaque forme phosphorylée (ou non) de la desmine.

La même stratégie sera appliquée à l' α B-cristalline. L'interaction entre la desmine et l' α B-cristalline sera déterminée par co-immunoprécipitation et western blot, ainsi que par électrophorèse en conditions non dénaturantes (également suivie d'un western blot). Les résultats seront validés par immunofluorescence (co-marquage et détermination des paramètres de Pearson ou de Manders, ou PLA). En parallèle, j'envisage de moduler le taux de phosphorylation de la desmine par le traitement des myotubes C2C12 par le 12-O-tétradécanylphorbol-13-acétate ou le 8-bromo-cAMP (Winter et al., 2014). La quantification de la variation de phosphorylation et de O-GlcNAcylation de la desmine seront investiguées selon l'approche décrite ci-dessus. Il peut également être envisagé de déterminer si les propriétés lectiniques de la desmine sont modulées consécutivement à la variation de phosphorylation ou de O-GlcNAcylation.

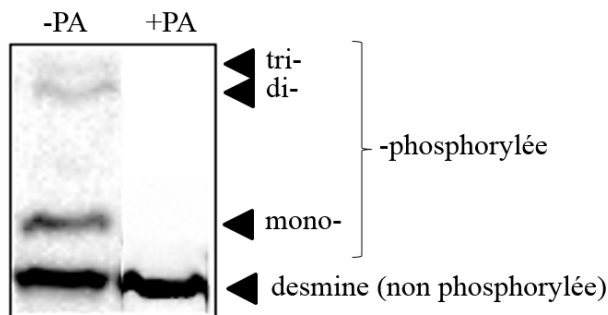


Figure 96 : Séparation électrophorétique de la desmine selon le nombre de groupements phosphate. L'extrait protéique est séparé sur gel de Phos-tagTM acrylamide, puis la desmine est détectée par western blot. Après traitement à la phosphatase alcaline (+PA), on ne visualise que la forme non phosphorylée de la desmine.

De manière plus spécifique, la desmine est phosphorylée sur de nombreux résidus de sérine ou de thréonine (Winter et al., 2014) ; il pourra donc être envisagé de transfecter des myoblastes C2C12 par de la desmine dont certains sites de phosphorylation auront été muté, et d'en analyser la répercussion sur la variation de O-GlcNAcylation de la desmine. Par ailleurs, à ce jour, seul un site de O-GlcNAcylation a été identifié au niveau de la desmine, correspondant à la sérine 460. Il est possible que d'autres résidus de sérine ou de thréonine soient modifiés par la O-GlcNAcylation ; en effet, de multiples sites potentiels de O-GlcNAcylation ont été identifiés sur la desmine (voir figure 97) d'après le moteur de recherche YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>), certains d'entre eux correspondant à des sites de mutation impliqués dans les myopathies myofibrillaires.

Nous envisageons d'augmenter le taux de O-GlcNAcylation au niveau des cellules C2C12 (à la fois au niveau des myoblastes et au niveau des myotubes), afin de saturer les sites de O-GlcNAcylation de la desmine et d'identifier des sites supplémentaires de O-GlcNAcylation. Ainsi, s'il existe plusieurs sites de O-GlcNAcylation au niveau de la desmine, nous pourrions appliquer à la desmine la méthodologie décrite au paragraphe 1.1.5. « Méthode de quantification des variations de O-GlcNAcylation *per site*. » afin de quantifier la variation de O-GlcNAcylation site à site.

Pour aller plus loin dans la compréhension de l'interaction desmine- α B-cristalline, nous quantifierons les paramètres d'interaction entre les deux protéines en utilisant la technique de résonance plasmonique de surface (SPR, Surface Plasmon Resonance). Le principe de la SPR est la mesure de l'interaction entre un analyte en solution et un ligand immobilisé sur un capteur ou puce. La SPR permet de mesurer la quantité d'analyte fixé au

senseur (donc au ligand), mais également l'affinité et la cinétique de l'interaction moléculaire (Liu et al., 2006b ; Nguyen et al., 2015). La desmine et l' α B-cristalline seront purifiées des cellules C2C12, notamment dans leur forme non modifiée, ainsi que sous forme phosphorylée ou O-GlcNAcylée. La desmine sera immobilisée sur le senseur, tandis que l' α B-cristalline sera l'analyte soluble. Cette approche permettra de déterminer les paramètres d'interaction entre la desmine et son chaperon moléculaire selon leur phosphorylation et/ou leur O-GlcNAcylation. Ce volet du projet sera envisagé dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Bernadette CODDEVILLE (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576, Lille).

Ce projet de recherche est inclus dans un projet portant sur la caractérisation du rôle des modifications post-traductionnelles de la desmine (phosphorylation et O-GlcNAcylation) dans des cellules musculaires cardiaques et squelettiques (projet DESMODIF, coordonné par le Dr Florence PINET, répondant à l'appel à projet ANR 2016).

2. Thème 2 - O-GlcNAcylation & myopathies myofibrillaires : focus sur les desminopathies.

Parmi toutes les protéines O-GlcNAcylées, des protéines clés de l'organisation sarcomérique ont été identifiées telles que l' α B-cristalline, la desmine (Cieniewski-Bernard et al., 2004 ; Cieniewski-Bernard et al., 2012), ainsi que la myotiline, ZASP (données du laboratoire non publiée), la filamine C et BAG3 (Deracinois et al., 2015a). De manière intéressante, certains sites de O-GlcNAcylation correspondent à des sites mutés dans certaines pathologies musculaires telles que les desminopathies (mutation de la sérine 460) (Deracinois et al., 2015a), mais également d'autres sites au niveau de la desmine (figure 97), ainsi qu'au niveau de ZASP et de la myotiline (sites potentiels de O-GlcNAcylation).

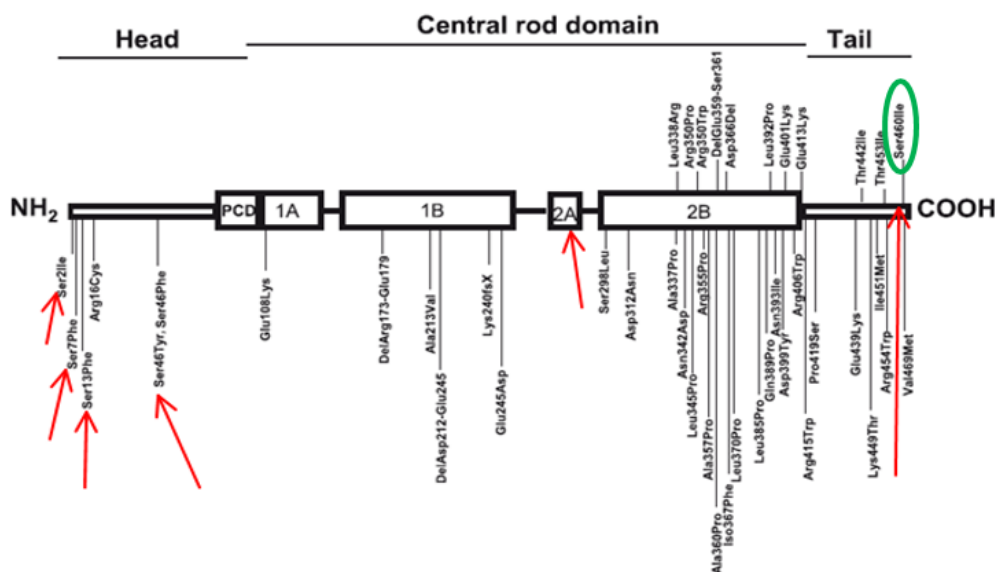


Figure 97 : Sites potentiels de O-GlcNAcylation au niveau de la desmine. Les flèches correspondent aux sites potentiels de O-GlcNAcylation identifiés grâce au moteur de recherche YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) ; en vert est entouré le site identifié au laboratoire. Les sites annotés sur la représentation schématique de la desmine correspondent à des sites mutés dans les desminopathies. (d'après Selcen, 2011).

2.1. Existe-t-il un lien entre la O-GlcNAcylation et la physiopathologie des myopathies myofibrillaires ?

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie des myopathies myofibrillaires (MMF) sont encore partiellement compris, et le rôle potentiel des modifications post-traductionnelles n'a pas encore été considéré. La compréhension du rôle des modifications post-traductionnelles pourrait permettre, non seulement de mieux comprendre la physiopathologie des MMF, mais également permettre l'émergence et le développement de nouvelles approches thérapeutiques destinées à limiter la déstructuration myofibrillaire et/ou la formation des agrégats.

2.1.1. Les myopathies myofibrillaires

Les myopathies myofibrillaires (MMF) sont des pathologies neuromusculaires cliniquement et génétiquement très hétérogènes, présentant un phénotype morphologique commun, plus particulièrement de dramatiques changements structuraux des myofibrilles (Joanne et al., 2011 ; Selcen, 2011). La caractéristique majeure des MMF est une faiblesse musculaire progressive ; la maladie débute généralement à l'âge adulte, et progresse rapidement. Ces MMF sont fréquemment associées à des cardiomyopathies et des neuropathies périphériques. Bien qu'un grand nombre de mutations soient aujourd'hui bien caractérisées, l'origine moléculaire de la pathologie est totalement inconnue pour de nombreux patients, et aucune thérapie n'est possible.

Le diagnostic est basé sur l'analyse de biopsies surlignant une réorganisation dramatique des fibres musculaires : leur architecture est modifiée, et leur diamètre est irrégulier, ce qui implique une désorganisation partielle ou totale des myofibrilles (Claeys et al., 2009). De plus, certaines structures cellulaires correspondent à une inclusion anormale de protéines. Il y a également une expression ectopique de nombreuses protéines dans les régions déstructurées des fibres (Selcen, 2011). Les fibres musculaires des patients souffrant de MMF présentent une désorganisation particulièrement marquée des stries Z. Cette structure fondamentale délimite et assemble les sarcomères, permettant donc la structuration des myofibrilles et la transmission de force. L'organisation « normale », saine, d'une myofibrille est représentée figure 98A, tandis que les effets déstructurants d'une mutation de la desmine sont représentés figure 98B-C.

Comme on peut le voir sur cette figure, la(les) mutation(s) de la desmine conduit (conduisent) à une désorganisation très marquée des stries Z, ainsi qu'à une fragmentation de la desmine qui va s'accumuler dans la myofibrille. Les filaments intermédiaires, desquels la desmine est un composant majeur, vont perdre leur intégrité, et en conséquence, les myofibrilles vont également perdre leur intégrité structurale. A termes, les répercussions seront dramatiques pour la fonction musculaire : à cause de la déstructuration du sarcomère, le glissement des filaments fins le long des filaments épais, à l'origine de la contraction musculaire, devient impossible, de même que la transmission de force. De plus, cette perte de structuration va engendrer une fragilité de la fibre lors du développement de force.

Parmi les protéines structurales, autre que la desmine, impliquées dans l'organisation du sarcomère et des myofibrilles, l' α B-cristalline, la myotiline, la filamine C, ZASP (Z-band alternatively spliced PDZ motif-containing protein), et BAG3 (Bcl-2 associated athanogene 3), codées par les gènes DES, CRYAB, MYOT, FLNC, ZASP et BAG3 respectivement, sont également connues comme étant impliquées dans les MMF lorsqu'elles sont mutées. Ainsi, la mutation de l'une ou l'autre de ces protéines compromet la formation du sarcomère ou des filaments intermédiaires en raison de la perte des interactions protéine-protéine ou de la polymérisation, conduisant *in fine* aux MMF. En conséquence, les protéines s'accumulent dans les cellules musculaires sous forme d'agrégats insolubles, en grande partie responsable de la physiopathologie des MMF. Ainsi, bien que certaines caractéristiques morphologiques varient lors des MMF, les inclusions intracytoplasmiques constituent une véritable « marque » des MMF (Olive et al., 2011). Cependant, ces protéines structurales mutées ne sont les seules protéines constitutives des agrégats puisque des protéines cytosquelettiques et myofibrillaires, des chaperons moléculaires, des protéines du stress oxydant et du système ubiquitine-protéasome précipitent avec elles (Kley et al., 2013 ; Maerkens et al., 2013).

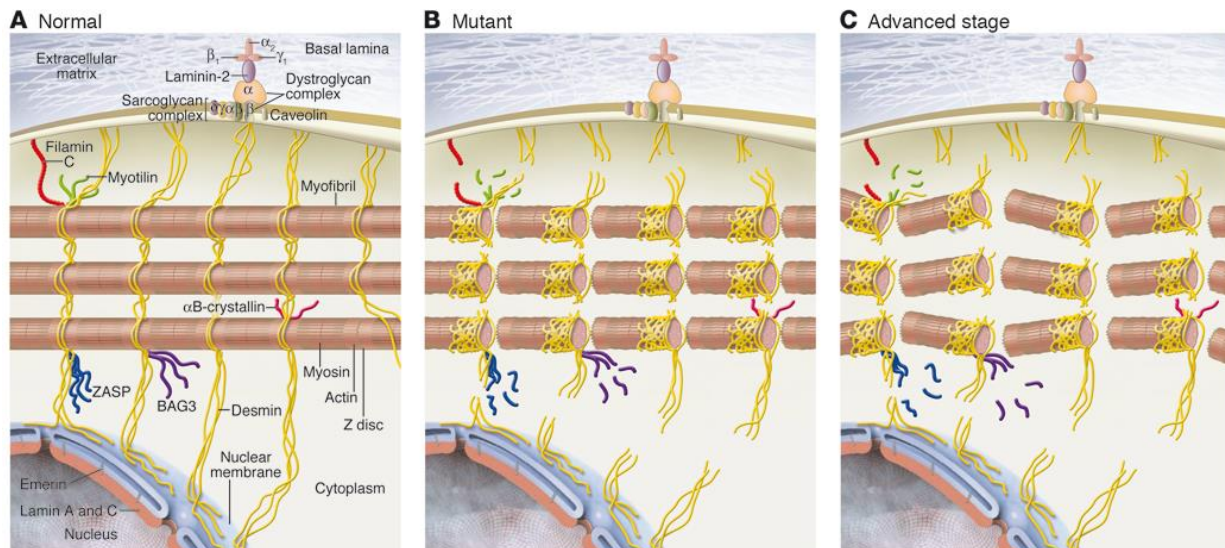


Figure 98 : Représentation schématique des effets de mutation(s) de desmine dans les muscles de patients souffrant de desminopathies. (A) Cytoarchitecture moléculaire « normale » d'un myocyte. (B) Effets destructifs de la mutation de la desmine. Notez la désorganisation de la strie Z, conduisant à la perte d'intégrité du réseau de filaments intermédiaires. (C) Accumulation de dépôts insolubles résultant de la fragmentation de la desmine, conduisant à la déstabilisation des myofibrilles, rompant les connexions entre elles ainsi qu'avec la membrane. (d'après Goldfarb & Dalakas, 2009).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des MMF (en particulier ceux impliqués dans l'agrégation protéique) sont hétérogènes et restent encore mal compris. Parmi eux, une mauvaise conformation des protéines (Ellis & Pinheiro, 2002), le stress oxydant (Janue et al., 2007), un défaut du processus de dégradation protéasomale (Olive, 2009), un défaut du processus des calpaïnes (von Nandelstadh et al., 2011), l'accumulation des vacuoles autophagiques (Selcen, 2011) et un défaut des interactions protéine-protéine entre les protéines structurales (Goldfarb & Dalakas, 2009) sont des processus cellulaires altérés dans la physiopathologie de MMF. Il est à noter que ces mécanismes sont modulés par la phosphorylation, et que cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la solubilité

des filaments intermédiaires. D'ailleurs, un lien entre la desmine et ses formes phosphorylées a été évoqué il y a quelques années (Caron & Chapon, 1999 ; Rappaport et al., 1988). Cependant, aucune hypothèse quant à l'implication de la phosphorylation n'a été évoquée.

2.1.2. Un lien possible avec la O-GlcNAcylation ?

Alors qu'il est établi que la phosphorylation participe à chaque processus moléculaire impliqué dans la physiopathologie des MMF, un certain nombre d'arguments suggère également que la O-GlcNAcylation pourrait être tout aussi importante. En effet, la O-GlcNAcylation est abondante sur les protéines cytosquelettiques ; en particulier, les cytokératines 8 et 18, impliquées dans le développement et la différenciation de nombreux tissus, sont O-GlcNAcylées. De manière intéressante, tandis que la phosphorylation régule les interactions protéiques, l'ubiquitination et l'organisation des filaments intermédiaires, la O-GlcNAcylation module le taux de phosphorylation des filaments intermédiaires (Farach & Galileo, 2008 ; Slawson et al., 2008), augmentant la solubilité des kératines (Rotty et al., 2010 ; Srikanth et al., 2010), l'ubiquitination et la dégradation protéasomale des protéines constitutives des filaments intermédiaires (Ruan et al., 2013a). Il est important de souligner que les filaments intermédiaires, le système protéasomal ainsi que les interactions protéine-protéine sont des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie des desminopathies, et de manière plus large, dans les MMF.

Une modification du nombre de motifs O-GlcNAc est étroitement associée à la physiopathologie de nombreuses pathologies, telles que les maladies neurodégénératives (Zhu et al., 2014), le cancer (Ma & Vosseller, 2014), les maladies cardiovasculaires (Dassanayaka & Jones, 2014) ou le diabète de type II (Ma & Hart, 2013). Un lien entre la O-GlcNAcylation et les pathologies neuromusculaires a également été établi, notamment dans l'amyotrophie spinale de type I (Chou & Wang, 1997), la polymyosite, les dermatomyosite, la myosite sporadique à corps d'inclusion, les dystrophies musculaires, l'atrophie musculaire neurogénique, la rhabdomyolyse, ou encore la myopathie distale (Nakamura et al., 2012). La O-GlcNAcylation est également impliquée dans le développement de l'atrophie musculaire (Cieniewski-Bernard et al., 2006 ; Huang et al., 2011), un rôle potentiel protecteur de la O-GlcNAcylation vis-à-vis de la dégradation protéasomale ayant été suggéré (Cieniewski-Bernard et al., 2006) ; en ce sens, la O-GlcNAcylation joue un rôle important dans la protéostasie, en particulier lorsque les protéines sont mal conformées ou endommagées (Ruan et al., 2013a). Il a notamment été suggéré que la compréhension du lien entre le O-GlcNAcylation et le système protéasomale pourrait permettre le développement de thérapies pour les maladies associées à l'accumulation d'agrégats protéiques conjugués à l'ubiquitine dans les corps d'inclusion pathologiques (Ruan et al., 2013a).

2.2. Caractérisation de l'effet d'une modulation du taux de O-GlcNAcylation dans un modèle murin de desminopathies : focus sur les mutations S13F, E413K et S460I.

Comme nous l'avons vu précédemment, les MMF sont des maladies multifactorielles ;

or, les mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie des MMF sont régulés par la phosphorylation et la O-GlcNAcylation. En considérant différentes données bibliographiques, associées à des données préliminaires obtenues au laboratoire, nous proposons que des changements du pattern de O-GlcNAcylation de protéines musculaires d'un modèle murin de desminopathies pourrait moduler des interactions protéine-protéine et/ou l'agrégation protéique (ces mécanismes cellulaires étant fortement impliqués dans le développement des MMF), potentiellement *via* le renforcement de certaines interactions protéine-protéine impliquant des petites protéines de choc thermique. Par ailleurs, de par le rôle régulateur exercé par la O-GlcNAcylation au niveau des propriétés contractiles (pour revue, Cieniewski-Bernard et al., 2014c), nous proposons que la modulation de la O-GlcNAcylation pourrait améliorer le processus contractiles au niveau de muscles déficients lors de desminopathies, voire de manière plus générale, dans les MMF.

L'objectif majeur de ce projet est de déterminer si la O-GlcNAcylation peut être associé à un gain ou une perte de fonction dans les muscles squelettiques souffrant de desminopathies. Nous déterminerons donc si la O-GlcNAcylation peut atténuer le phénotype des desminopathies, par la prévention de l'accumulation des agrégats protéiques, véritable marqueur des MMF, mais également améliorer les propriétés contractiles puisque les desminopathies sont associées à une diminution des capacités musculaires.

Ce projet de recherche sera effectué dans un modèle animal de desminopathies. Il existe différents modèles animaux de desminopathies, tous présentant des répercussions structurales, en particulier une désorganisation marquée des myofibrilles et des mitochondries déformées, ainsi que des signes physiologiques, notamment une perte de fonction musculaire (Hnia et al., 2015). Un modèle de desminopathies, généré par l'injection d'un virus adeno-associé (AAV, adeno-associated viruses) portant une version mutée de la desmine au niveau des acides aminés suivants : Arg406Trp ou Glu413Lys (AAV-DesR406W ou AAV-DesE413K, respectivement), a été récemment développé (Joanne et al., 2013). Ce modèle murin par AAV reproduit le phénotype des patients MMF, en particulier une perturbation de la cytoarchitecture des cellules musculaires (perte de l'alignement des stries Z), agrégation de la desmine au niveau du sarcolemme et des zones périnucléaires, des changements morphologiques du muscle, et une diminution des fonctions musculaires (perte de la fonction du muscle à générer une force). Un groupe de souris témoins, correspondant au groupe AAV-DesWT, va exprimer la desmine sauvage (wild type) ; afin de distinguer la desmine endogène de la desmine issue du transgène, un tag c-Myc sera introduit au niveau de l'ADNc de la desmine (Joanne et al., 2013).

Ainsi, chez des souris C57BL/6, la desminopathie sera induite par injection d'AAV portant la mutation E413K. Cette mutation est caractérisée par des agrégats protéique (figure 99), avec des structures en forme d'anneaux ("ring-like") au niveau de la strie Z, ainsi qu'une diminution de la force maximale (Joanne et al., 2013).

Une seconde mutation, bien décrite dans les desminopathies, sera également considérée dans ce projet. Ce site est localisé au niveau du domaine C-terminal de la desmine, correspondant à la mutation S460I. De manière intéressante, nous avons identifié au laboratoire ce site de mutation comme O-GlcNAcylé (Deracinois B et al., 2015). Une

troisième mutation, correspondant à la mutation S13F, localisée en N-terminal de la desmine, sera également induite au niveau des AAV-Des. Cette troisième mutation correspond à un site particulier localisé dans un domaine peptide (nonapeptide) très conservé, phosphorylé par la PKC (Pica et al., 2008). Ce site est particulièrement intéressant puisque la mutation S13F est la seule mutation caractérisée affectant un site régulateur modifié au niveau post-traductionnel (Clemen et al., 2013 ; Winter et al., 2014). Pour chaque groupe (AAV-DesWT, AAV-DesE413K, AAV-DesS460I, et AAV-DesS13F), le taux de O-GlcNAcylation sera augmenté par shOGA tandis que le taux de O-GlcNAcylation sera diminué par un shOGT (Bond & Hanover, 2015).

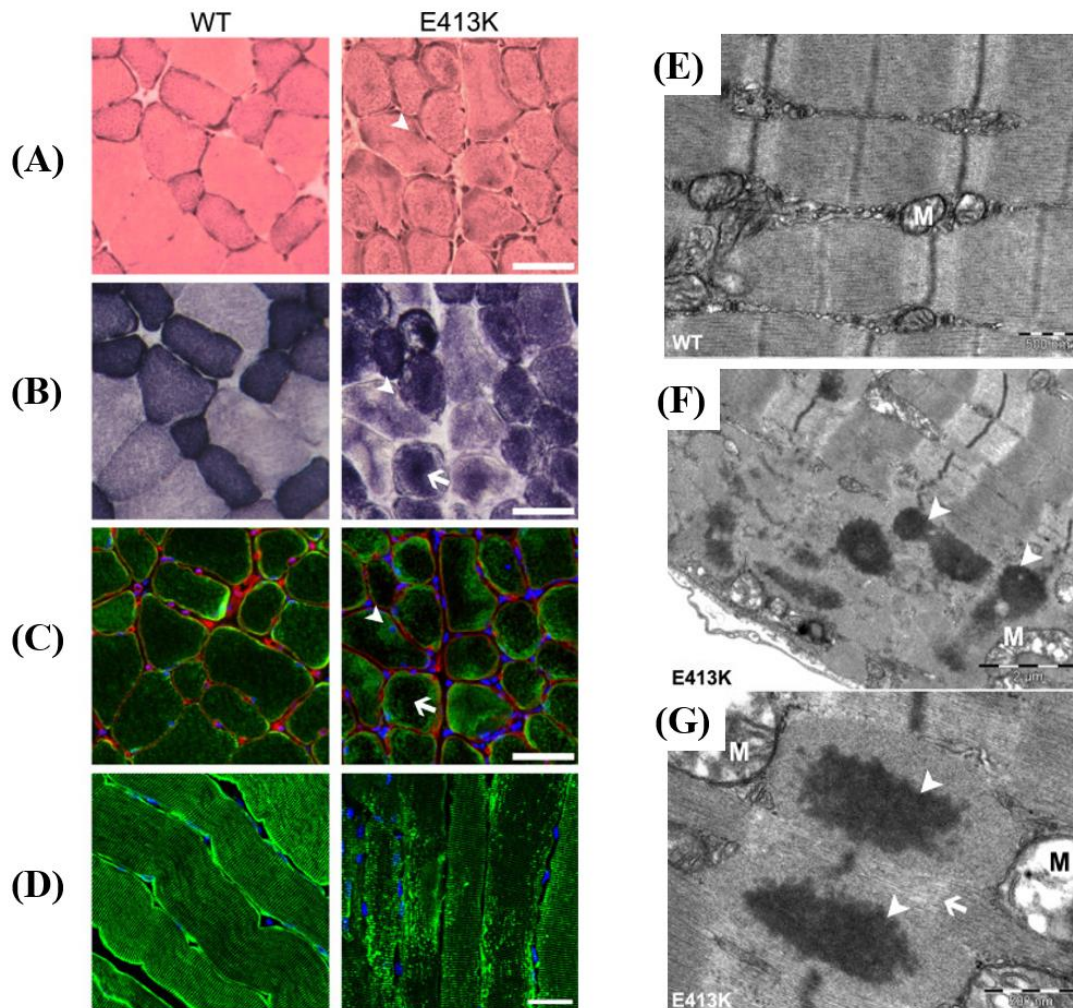


Figure 99 : Perturbations morphologiques induites par le mutant E413K de la desmine. (A) Coloration éosine-hématoxyline. (B) Coloration de la succinate déshydrogénase. (C) Marquage par immunofluorescence de c-Myc (en vert) ou du perlécane (en rouge). (D) Marquage par immunofluorescence de c-Myc sur des coupes longitudinales. (E-G) Perturbations de l'ultrastructure induites par la mutation E413K de la desmine au niveau du tibialis anterior, visualisées par microscopie électronique. (E) Ultrastructure du muscle exprimant la desmine WT. (F-G) Ultrastructure du tibialis anterior exprimant la desmine mutée. (d'après Joanne et al., 2013). (A-D) Les flèches pleines indiquent l'accumulation de desmine dans la région périnucléaire, les flèches ouvertes l'accumulation de la desmine ; barre d'échelle : 30 μ m. (E-G) Les flèches pleines indiquent l'accumulation de matériel dense granulo-filamenteux. M : mitochondrie.

Les vecteurs AAV exprimant les mutations de la desmine et les shRNA destinés à moduler le taux global de O-GlcNAcylation seront délivrés au niveau musculaire par des injections intramusculaires chez des souris C57BL/6 femelles de 15 semaines, comme cela a été précédemment décrit (Joanne et al., 2013). Quatre semaines après l'injection des AAV, les propriétés contractiles seront déterminées au niveau du tibialis anterior, en particulier l'endurance, la force isométrique, ainsi que le développement de la force tétanique afin de déterminer les effets de la modulation du taux global de O-GlcNAcylation au niveau des mutants DesE413K, DesS460I et DesS13F. A l'issue de la mesure des paramètres contractiles, les muscles seront prélevés puis congelés. La morphologie globale du muscle sera déterminée à partir de sections transversales après coloration éosine/hématoxyline. Après coloration de la succinate déshydrogénase, nous déterminerons la distribution et la localisation des mitochondries (en effet, on note une accumulation anormale des mitochondries dans les desminopathies), tandis que la coloration au rouge Sirius permettra de déterminer l'index de fibrose (ratio entre les surfaces de fibrose sur les surfaces de fibres). Afin d'observer l'accumulation de desmine, mais aussi pour accéder au pattern de striation, le tag c-Myc sera détecté par immunofluorescence au niveau des sections transversales et longitudinales des muscles. Enfin, l'ultrastructure du sarcomère sera analysée par microscopie électronique, afin de visualiser l'apparition de matériel dense granulo-filamentaire, correspondant à des agrégats protéiques. Toutes ces données permettront de déterminer les répercussions structurales de la variation de O-GlcNAcylation dans des muscles présentant une mutation de la desmine, mais nous déterminerons également les répercussions fonctionnelles par l'analyse des propriétés contractiles sur muscle entier mais également sur fibres isolées.

Afin de mieux comprendre le rôle potentiel de la O-GlcNAcylation dans la formation des agrégosomes, nous envisageons une analyse protéomique de ces agrégats. L'analyse protéomique est une méthode de choix pour l'identification du contenu protéique des agrégats, comme cela a été récemment effectué pour les desminopathies ou les filaminopathies (Kley et al., 2013 ; Maerkens et al., 2013). Nous identifierons et quantifierons des agrégats protéiques dans les muscles présentant une desminopathie, et dont les taux de O-GlcNAcylation auront été augmentés ou diminués. Nous combinerons la microdissection laser (afin d'exciser les agrégats des coupes de tissus) et l'analyse par spectrométrie de masse de type label-free (voir 1.3. « Principales stratégies de protéomique quantitative. » dans la revue de littérature du chapitre I des travaux personnels « O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques ») basée sur l'intensité du signal de l'ion précurseur (figure 100). L'objectif est de déterminer si la O-GlcNAcylation peut moduler les composants protéiques des agrégats, voire prévenir l'agrégation des protéines.

J'envisage également d'analyser ces agrégats protéiques par imagerie MALDI, une méthode récente et très puissante pour l'analyse de la distribution spatiale des molécules par une analyse *in situ* de sections de tissus (voir 1.3.3. « Autres approches d'analyse protéomique. » dans la revue de littérature du chapitre I des travaux personnels « O-GlcNAcylation, protéomique & développements méthodologiques. »). L'imagerie MALDI est une stratégie novatrice permettant une analyse sans précédent des tissus avec une très grande précision (Aichler & Walch, 2015 ; Longuespee et al., 2014). En particulier, depuis sa mise en

place il y a une dizaine d'années, l'imagerie MALDI est devenue un outil très puissant pour l'identification de biomarqueurs, avec l'avantage de conserver la résolution spatiale de ces marqueurs, permettant de « profiler » les tissus et de compléter les données histopathologiques (Fournier et al., 2008 ; Franck et al., 2013). L'analyse protéomique sera effectuée sur les muscles prélevés de souris ayant reçu les injections des AAV-DesS13F, AAV-DesE413K et AAV-DesS460I. Les données recueillies grâce à cette approche, jamais appliquée à des muscles squelettiques présentant une myopathie myofibrillaire, permettra de déterminer une « signature » de ces agrégats. Une analyse statistique sera aussi réalisée afin de comparer la composition des agrégats et de déterminer si leur composition est modifiée. De plus, une micro-extraction pourra être effectuée au niveau des régions présentant des agrégats protéiques et de régions voisines sans agrégats protéiques afin d'obtenir des informations concernant la composition moléculaire de ces deux régions avec le respect de leur localisation.

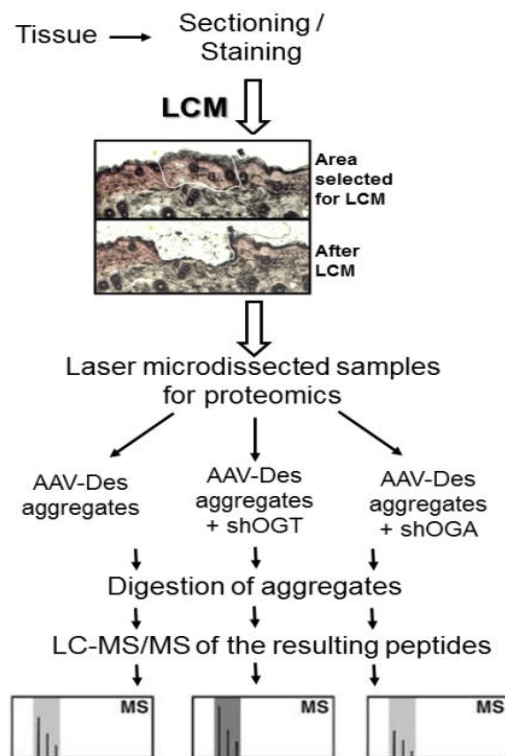


Figure 100 : Représentation schématique de la stratégie d'analyse protéomique pour l'identification et la quantification des composants protéiques des agrégats résultant de mutation de la desmine. Combinaison de la microdissection laser et de l'analyse protéomique label-free. Cette méthodologie sera appliquée à des muscles présentant une desminopathie par rapport à des muscles présentant une desminopathie et dont les taux de O-GlcNAcylation auront été modulé par un shRNA. (modifié d'après Datta et al., 2015).

Ce projet est actuellement en cours d'évaluation par l'AFM-Téléthon (projet DES-GlcNAc, que j'ai cité précédemment). Il sera effectué en collaboration avec trois autres équipes de recherche : (i) l'équipe de Pr Onnik AGBULUT (UMR8256, équipe « Cellules Souches et Biothérapies », qui développera le modèle murin de desminopathie) ; (ii) l'équipe du Pr Isabelle FOURNIER (INSERM U1192 PRISM), unité reconnu dans le domaine de l'analyse protéomique par imagerie MALDI et de la microprotéomique tissulaire ; ainsi que (iii) l'équipe du Dr Luc CAMOIN (Plateforme Marseille Protéomique).

3. Thème 3 : O-GlcNAcylation, homéostasie protéique et protéines myofibrillaires.

Divers travaux mettent en évidence que les protéines constitutives du sarcomère (incluant à la fois les protéines contractiles et les protéines structurales) sont des cibles préférentielles de divers systèmes de dégradation, permettant un remodelage sarcomérique à la fois dans des conditions physiologiques (turn-over des protéines myofibrillaires) mais aussi dans des conditions pathologiques (cachexie, atrophie, myopathies myofibrillaires, dystrophie de Duchenne...) (Goll et al., 2003 ; Goll et al., 2008). Dans le muscle squelettique, quatre systèmes protéolytiques participent à la dégradation de ces protéines myofibrillaires : (i) le système ubiquitine-protéasome, (ii) les calpaïnes, (iii) les caspases, ou encore (iv) l'autophagie (pour revue, Goll et al., 2008 ; Sandri, 2008). La dégradation des protéines myofibrillaires se fait selon un processus séquentiel faisant intervenir plusieurs systèmes de dégradation. Ainsi, les calpaïnes, localisées à proximité du disque Z, vont permettre la dissociation de protéines de la structure myofibrillaire, étape nécessaire permettant la prise en charge par le protéasome pour être dégradées (Goll et al., 2003 ; Goll et al., 2008 ; von Nandelstadh et al., 2011). De la même manière, l'activation de la caspase-3 serait aussi une étape initiale de la dégradation des protéines myofibrillaires, dégradant partiellement l'actomyosine et générant des fragments pouvant ensuite être pris en charge par le système ubiquitine-protéasome (Du et al., 2004). Une représentation schématique de ce processus (ici pour la myotiline) est présentée figure 101.

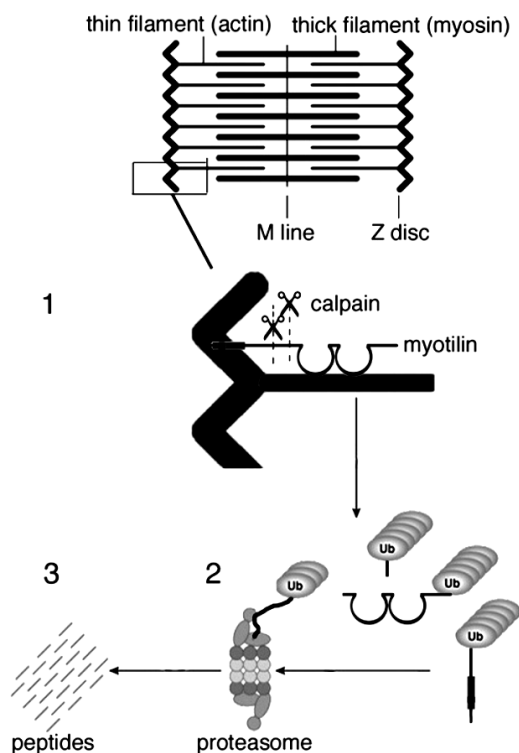


Figure 101 : Représentation schématique du processus de dégradation de la myotiline dans les cellules musculaires. *Le turn-over de la myotiline est initié par un clivage par les calpaïnes. La myotiline ainsi clivée est ensuite dégradée par le système ubiquitine-protéasome. Des mutations de la myotiline la rendent résistante à la dégradation, conduisant à la formation d'agrégats intracellulaires, délétères pour la cellule musculaire. (d'après von Nandelstadh et al., 2011).*

Ces processus de dégradation doivent être étroitement régulés afin de maintenir l'homéostasie protéique du tissu. Parmi les différents systèmes de régulation des processus de protéolyse (tels que les inhibiteurs intracellulaires, la phosphorylation des enzymes et/ou des

substrats...), il semblerait que la O-GlcNAcylation puisse aussi jouer un rôle très important, bien que probablement sous-estimé. En effet, de nombreux travaux attestent du rôle indéniable de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la dégradation protéasomale (Guinez et al., 2008 ; Zachara & Hart, 2006 ; Zhang et al., 2003). Des données récentes ont également fait le lien entre O-GlcNAcylation et flux autophagique, *via* une modification des protéines BECN1 et BCL2 (Marsh et al., 2012 ; Wang & Hanover, 2013), ainsi qu'une modulation de la dégradation par les calpaïnes (Liu et al., 2007b). De manière intéressante, l'activité des calpaïnes est modulée non seulement par le calcium ou par son inhibiteur spécifique, la calpastatine, mais aussi selon l'état de phosphorylation des substrats (Goll et al., 2003). Enfin, il semblerait que l'OGT et l'OGA soient localisées préférentiellement au niveau sarcomérique (Cieniewski-Bernard et al., 2014b), suggérant un rôle prépondérant de la O-GlcNAcylation au niveau des protéines constitutives du sarcomère, qu'il s'agisse des protéines contractiles ou structurales. Rappelons également que les sites de O-GlcNAcylation d'une protéine structurale clé, la titine, sont localisés dans un domaine voisin du site de liaison de l'E3 ubiquitine ligase MuRF1 (Deracinois et al., 2015a). L'ensemble de ces différents travaux suggèrent un rôle prépondérant de la O-GlcNAcylation dans la modulation de la dégradation de l'appareil contractile.

Afin d'activer les systèmes de dégradation des protéines myofibrillaires, les cellules C2C12 seront traitées par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (McClung et al., 2009). Ce traitement sera associé à une modulation du taux de O-GlcNAcylation comme décrit précédemment. Afin de discriminer l'effet de la O-GlcNAcylation sur une voie de dégradation donnée, les autres voies de dégradation seront inhibées par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, tels que le Z-LLY-FMK pour les calpaïnes ou le MG132 pour la voie protéasomale par exemple. Nous caractériserons également la morphologie des myotubes par marquage des chaînes lourdes de myosine. La mesure de l'activité enzymatique des principaux acteurs des voies de dégradation sera effectuée par dosage de la quantité de produit formé après clivage spécifique du substrat, par mesure de la fluorescence ou de luminescence émise. L'activité des caspases et l'activité protéasomale seront quantifiées selon la même approche en utilisant des kits commerciaux de mesure des calpaïnes, cathepsines, caspases et protéasome. L'activation du protéasome sera également analysée en établissant un profil des protéines polyubiquitinylées. Les protéines ubiquitinylées seront immunoprécipitées puis séparées par SDS-PAGE. Une analyse protéomique permettra une identification sans a priori de ces protéines, puis une analyse plus ciblée sera réalisée par western blot. Enfin, nous envisageons d'induire la dégradation protéique par autophagie en traitant les cellules C2C12 par le SMER28 (Small-Molecule Enhancer of Rapamycin-28), et de mesurer le taux d'expression des protéines Beclin-1, ainsi que LC3B-I et LC3B-II (la conversion de LC3B-I en LC3B-II étant une étape critique d'activation du système d'autophagie (Sandri, 2010). De la même manière que pour les autres voies de dégradation, les cellules seront traitées simultanément avec des agents modulateurs du taux de O-GlcNAcylation. Les protéines myofibrillaires spécifiquement dégradées par chacune de ces voies seront analysées par SDS-PAGE et western blot.

4. Perspectives à long terme.

Nos résultats préliminaires, associés à certaines données bibliographiques, renforcent notre hypothèse selon laquelle la O-GlcNAcylation pourrait être le « lien manquant » pour une compréhension beaucoup plus fine des processus gouvernant l'organisation sarcomérique. Ainsi, la caractérisation du rôle de la O-GlcNAcylation dans la modulation des interactions protéine-protéine, dans l'organisation sarcomérique et son homéostasie (notamment la dégradation des protéines myofibrillaires), pourrait avoir un impact important dans le domaine de la physiopathologie du muscle squelettique, mais également dans un domaine plus large concernant les protéopathies. Les données découlant de ce projet de recherche pourraient conduire à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou à la caractérisation de nouveaux marqueurs des myopathies myofibrillaires (MMF). Les MMF sont les pathologies multifactorielles, résultant de la perte d'interaction entre des protéines myofibrillaires, notamment des protéines structurales telles que la desmine, l' α B-cristalline, BAG3, ZASP, la filamine C et la myotiline. Les MMF sont essentiellement dues à la mutation de l'une ou l'autre de ces protéines, conduisant à la perte d'interactions protéiques, et un défaut des processus de dégradation est également associé à la physiopathologie des MMF. Dans la majorité des cas, il y a accumulation des protéines sous forme d'agrégats insolubles, marqueurs histologiques des MMF, mais le diagnostic des MMF reste encore difficile.

Par une meilleure compréhension de la modulation de l'interaction entre la desmine et son chaperon moléculaire par les modifications post-traductionnelles, notamment la O-GlcNAcylation mais aussi la phosphorylation, ce projet pourrait « à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, de nombreuses données présentent les petites protéines de choc thermique (sHSP, small Heat Shock Proteins) comme une « première ligne de défense », en particulier dans la prévention de l'agrégation irréversible des protéines dénaturées (Haslbeck & Vierling, 2015). En ce sens, un nouveau rôle de l' α B-cristalline en tant qu'agent thérapeutique a récemment émergé (Elliott et al., 2013 ; Houck et al., 2011 ; Reddy & Reddy, 2015). Comme la desmine et l' α B-cristalline sont liées au disque Z, véritable point nodal à l'organisation sarcomérique, et en raison de leur rôle essentiel à la cytoarchitecture du muscle squelettique, il est essentiel de déterminer si la modulation de phosphorylation et/ou de O-GlcNAcylation de la desmine et/ou de l' α B-cristalline pourrait limiter l'agrégation de la desmine en un complexe insoluble. Les données issues de ce projet pourraient permettre de mettre en évidence de nouvelles stratégies destinées à prévenir ou à contrer l'agrégation protéique via le renforcement d'interaction protéine-protéine impliquant des petites protéines de choc thermique.

Nous proposons également d'identifier les protéines constitutives des agrégats protéiques par une approche d'analyse protéomique « label-free » après microdissection laser. Cette approche, jamais appliquée à des sections de muscles présentant une myopathie myofibrillaire, pourrait être une étape importante pour l'utilisation de l'imagerie à des fins diagnostiques de MMF à partir de biopsies de patients.

Bibliographie

Références bibliographiques

- A -

- Abdul-Ghani MA (2013). Type 2 diabetes and the evolving paradigm in glucose regulation. *Am.J.Manag.Care.* **19**, S43-S50.
- Abu-Farha M, Elisma F, Figeys D (2008). Identification of protein-protein interactions by mass spectrometry coupled techniques. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* **110**, 67-80.
- Adessi C, Miege C, Albrieux C, Rabilloud T (1997). Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* **18**, 127-135.
- Aebersold R and Mann M (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* **422**, 198-207.
- Agard NJ, Baskin JM, Prescher JA, Lo A, Bertozzi CR (2006). A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem Biol.* **1**, 644-648.
- Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR (2004). A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J Am.Chem Soc.* **126**, 15046-15047.
- Agarkova I and Perriard JC (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol.* **15**, 477-485.
- Aggarwal K, Choe LH, Lee KH (2006). Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.* **5**, 112-120.
- Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Choudhary MI, Rafik SM, Shakoory AR (2006). Phosphorylation and glycosylation interplay: protein modifications at hydroxy amino acids and prediction of signaling functions of the human beta3 integrin family. *J.Cell Biochem.* **99**, 706-718.
- Aichler M, Elsner M, Ludyga N, Feuchtinger A, Zangen V, Maier SK, Balluff B, Schone C, Hierber L, Braselmann H, Meding S, Rauser S, Zischka H, Aubele M, Schmitt M, Feith M, Hauck SM, Ueffing M, Langer R, Kuster B, Zitzelsberger H, Hofler H, Walch AK (2013). Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria. *J Pathol.* **230**, 410-419.
- Aichler M and Walch A (2015). MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab Invest.* **95**, 422-431.
- Akita S, Umezawa N, Kato N, Higuchi T (2008). Array-based fluorescence assay for serine/threonine kinases using specific chemical reaction. *Bioorg.Med.Chem.* **16**, 7788-7794.
- Alfaro JF, Gong CX, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TR, Purvine SO, Wang Z, Camp DG, Shabanowitz J, Stanley P, Hart GW, Hunt DF, Yang F, Smith RD (2012). Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **109**, 7280-7285.
- Andrali SS, Qian Q, Ozcan S (2007). Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J.Biol.Chem.* **282**, 15589-15596.
- Arias EB, Kim J, Cartee GD (2004). Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes.* **53**, 921-930.
- Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE (2001). Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ.Res.* **88**, 763-773.

Bibliographie

Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P (2007). Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett.* **581**, 3665-3674.

Au Y (2004). The muscle ultrastructure: a structural perspective of the sarcomere. *Cell Mol.Life Sci.* **61**, 3016-3033.

- B -

Baldwin KM, Herrick RE, McCue SA (1993). Substrate oxidation capacity in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J.Appl.Physiol (1985.)*. **75**, 2466-2470.

Ball LE, Berkaw MN, Buse MG (2006). Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol.Cell Proteomics.* **5**, 313-323.

Banerjee PS, Hart GW, Cho JW (2013). Chemical approaches to study O-GlcNAcylation. *Chem Soc.Rev.* **42**, 4345-4357.

Banerjee PS, Ma J, Hart GW (2015). Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **112**, 6050-6055.

Banerjee S, Robbins PW, Samuelson J (2009). Molecular characterization of nucleocytosolic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology.* **19**, 331-336.

Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal.Bioanal.Chem.* **389**, 1017-1031.

Bassel-Duby R and Olson EN (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu.Rev.Biochem.* **75**, 19-37.

Bastide B, Conti A, Sorrentino V, Mounier Y (2000). Properties of ryanodine receptor in rat muscles submitted to unloaded conditions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **270**, 442-447.

Bastide B, Kischel P, Puterflam J, Stevens L, Pette D, Jin JP, Mounier Y (2002). Expression and functional implications of troponin T isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading. *Pflugers Arch.* **444**, 345-352.

Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* **80**, 1215-1265.

Beynon RJ, Doherty MK, Pratt JM, Gaskell SJ (2005). Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat.Methods.* **2**, 587-589.

Beynon RJ and Pratt JM (2005). Metabolic labeling of proteins for proteomics. *Mol Cell Proteomics.* **4**, 857-872.

Blumenthal DK and Stull JT (1980). Activation of skeletal muscle myosin light chain kinase by calcium(2+) and calmodulin. *Biochemistry.* **19**, 5608-5614.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* **294**, 1704-1708.

Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJ (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat.Protoc.* **4**, 484-494.

Boldt K, Gloeckner CJ, Texier Y, von ZF, Ueffing M (2014). Applying SILAC for the differential analysis of protein complexes. *Methods Mol.Biol.* **1188**, 177-190.

Bibliographie

- Bonaldo P and Sandri M (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis.Model.Mech.* **6**, 25-39.
- Bond MR and Hanover JA (2013). O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu.Rev.Nutr.* **33**, 205-229.
- Bond MR and Hanover JA (2015). A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol.* **208**, 869-880.
- Bonnell D, Longuespee R, Franck J, Roudbaraki M, Gosset P, Day R, Salzet M, Fournier I (2011). Multivariate analyses for biomarkers hunting and validation through on-tissue bottom-up or in-source decay in MALDI-MSI: application to prostate cancer. *Anal.Bioanal.Chem.* **401**, 149-165.
- Boonyarom O and Inui K (2006). Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf).* **188**, 77-89.
- Bortolotto SK, Cellini M, Stephenson DG, Stephenson GM (2000). MHC isoform composition and Ca(2+)- or Sr(2+)-activation properties of rat skeletal muscle fibers. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **279**, C1564-C1577.
- Bowers GN, Jr., Fassett JD, White E (1993). Isotope dilution mass spectrometry and the National Reference System. *Anal.Chem.* **65**, 475R-479R.
- Bozzo C, Spolaore B, Toniolo L, Stevens L, Bastide B, Cieniewski-Bernard C, Fontana A, Mounier Y, Reggiani C (2005). Nerve influence on myosin light chain phosphorylation in slow and fast skeletal muscles. *FEBS J.* **272**, 5771-5785.
- Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, Reggiani C (2003). Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **285**, C575-C583.
- Breitbart RE and Nadal-Ginard B (1986). Complete nucleotide sequence of the fast skeletal troponin T gene. Alternatively spliced exons exhibit unusual interspecies divergence. *J.Mol.Biol.* **188**, 313-324.
- Brenner B (1988). Effect of Ca²⁺ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**, 3265-3269.
- Brickley K, Pozo K, Stephenson FA (2011). N-acetylglucosamine transferase is an integral component of a kinesin-directed mitochondrial trafficking complex. *Biochim.Biophys.Acta.* **1813**, 269-281.
- Broschat KO, Gorka C, Page JD, Martin-Berger CL, Davies MS, Huang Hc HC, Gulve EA, Salsgiver WJ, Kasten TP (2002). Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J.Biol.Chem.* **277**, 14764-14770.
- Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* **414**, 813-820.
- Brownridge P, Holman SW, Gaskell SJ, Grant CM, Harman VM, Hubbard SJ, Lanthaler K, Lawless C, O'Cualain R, Sims P, Watkins R, Beynon RJ (2011). Global absolute quantification of a proteome: Challenges in the deployment of a QconCAT strategy. *Proteomics.* **11**, 2957-2970.
- Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, Court M, Vandenesch F, Garin J (2007). Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics.* **6**, 2139-2149.
- Bullen JW, Balsbaugh JL, Chanda D, Shabanowitz J, Hunt DF, Neumann D, Hart GW (2014). Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *J.Biol.Chem.* **289**, 10592-10606.

Bibliographie

Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur.J.Histochem.* **48**, 223-233.

Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW (2008). Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J.Biol.Chem.* **283**, 23557-23566.

- C -

Caiozzo VJ, Baker MJ, Herrick RE, Tao M, Baldwin KM (1994). Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J.Appl.Physiol* (1985.). **76**, 1764-1773.

Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S (2007). Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp.Cell Res.* **313**, 2063-2076.

Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M (2015). Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr.Opin.Cell Biol.* **32**, 113-120.

Capotosti F, Guernier S, Lammers F, Waridel P, Cai Y, Jin J, Conaway JW, Conaway RC, Herr W (2011). O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell.* **144**, 376-388.

Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997). Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal.Chem.* **69**, 4751-4760.

Caron A and Chapon F (1999). Desmin phosphorylation abnormalities in cytoplasmic body and desmin-related myopathies. *Muscle Nerve.* **22**, 1122-1125.

Cassano M, Quattrocchi M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M (2009). Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **30**, 243-253.

Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol.* **306**, 717-726.

Chaillou T, Kirby TJ, McCarthy JJ (2014). Ribosome biogenesis: emerging evidence for a central role in the regulation of skeletal muscle mass. *J.Cell Physiol.* **229**, 1584-1594.

Chalkley RJ, Thalhammer A, Schoepfer R, Burlingame AL (2009). Identification of protein O-GlcNAcylation sites using electron transfer dissociation mass spectrometry on native peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **106**, 8894-8899.

Champattanachai V, Netsirisawan P, Chaiyawat P, Phueaouan T, Charoenwattanasatien R, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, Svasti J (2013). Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics.* **13**, 2088-2099.

Chatham JC and Marchase RB (2010). Protein O-GlcNAcylation: A critical regulator of the cellular response to stress. *Curr.Signal.Transduct.Ther.* **5**, 49-59.

Chavez Zobel AT, Loranger A, Marceau N, Theriault JR, Lambert H, Landry J (2003). Distinct chaperone mechanisms can delay the formation of aggresomes by the myopathy-causing R120G alphaB-crystallin mutant. *Hum.Mol Genet.* **12**, 1609-1620.

Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X (2004). Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin.Cancer Res.* **10**, 8380-8385.

Bibliographie

- Chen YX, Du JT, Zhou LX, Liu XH, Zhao YF, Nakanishi H, Li YM (2006). Alternative O-GlcNAcylation/O-phosphorylation of Ser16 induce different conformational disturbances to the N terminus of murine estrogen receptor beta. *Chem.Biol.* **13**, 937-944.
- Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry.* **39**, 11609-11620.
- Cheng X and Hart GW (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J.Biol.Chem.* **276**, 10570-10575.
- Cheung HC, Wang CK, Malik NA (1987). Interactions of troponin subunits: free energy of binary and ternary complexes. *Biochemistry.* **26**, 5904-5907.
- Cheung WD, Sakabe K, Housley MP, Dias WB, Hart GW (2008). O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. *J.Biol.Chem.* **283**, 33935-33941.
- Chou CF, Smith AJ, Omary MB (1992). Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J.Biol.Chem.* **267**, 3901-3906.
- Chou SM and Wang HS (1997). Aberrant glycosylation/phosphorylation in chromatolytic motoneurons of Werdnig-Hoffmann disease. *J.Neurol.Sci.* **152**, 198-209.
- Chou TY, Hart GW, Dang CV (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J.Biol.Chem.* **270**, 18961-18965.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* **325**, 834-840.
- Christensen GL, Kelstrup CD, Lyngso C, Sarwar U, Bogebo R, Sheikh SP, Gammeltoft S, Olsen JV, Hansen JL (2010). Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol.Cell Proteomics.* **9**, 1540-1553.
- Cieniewski-Bernard C, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C, Pinet F (2008a). Proteomic analysis in cardiovascular diseases. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **35**, 362-366.
- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC (2004). 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.
- Cieniewski-Bernard C, Dupont E, Deracinois B, Lambert M, Bastide B (2014a). Multiplexed Detection of O-GlcNAc, Phosphoproteome, and Whole Proteome within the Same Gel. *Front Endocrinol.(Lausanne).* **5**, 184-
- Cieniewski-Bernard C, Dupont E, Richard E, Bastide B (2014b). Phospho-GlcNAc modulation of slow MLC2 during soleus atrophy through a multienzymatic and sarcomeric complex. *Pflugers Arch.*
- Cieniewski-Bernard C, Lambert M, Dupont E, Montel V, Stevens L, Bastide B (2014c). O-GlcNAcylation, contractile protein modifications and calcium affinity in skeletal muscle. *Front Physiol.* **5**, 421-
- Cieniewski-Bernard C, Montel V, Berthoin S, Bastide B (2012). Increasing O-GlcNAcylation Level on Organ Culture of Soleus Modulates the Calcium Activation Parameters of Muscle Fibers. *PLoS.One.* **7**, e48218-
- Cieniewski-Bernard C, Montel V, Stevens L, Bastide B (2009). O-GlcNAcylation, an original modulator of contractile activity in striated muscle. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **30**, 281-287.
- Cieniewski-Bernard C, Mounier Y, Michalski JC, Bastide B (2006). O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J.Appl.Physiol.* **100**, 1499-1505.

Bibliographie

- Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, Drobecq H, Dubois E, Pottiez G, Thuillez C, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2008b). Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J.Proteome.Res.* **7**, 5004-5016.
- Claeys KG, van der Ven PF, Behin A, Stojkovic T, Eymard B, Dubourg O, Laforet P, Faulkner G, Richard P, Vicart P, Romero NB, Stoltenburg G, Udd B, Fardeau M, Voit T, Furst DO (2009). Differential involvement of sarcomeric proteins in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* **117**, 293-307.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC (2002). Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**, 637-706.
- Clark PM, Dweck JF, Mason DE, Hart CR, Buck SB, Peters EC, Agnew BJ, Hsieh-Wilson LC (2008). Direct in-gel fluorescence detection and cellular imaging of O-GlcNAc-modified proteins. *J.Am.Chem.Soc.* **130**, 11576-11577.
- Clark PM, Rexach JE, Hsieh-Wilson LC (2013). Visualization of O-GlcNAc glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable poly(ethylene glycol) mass tags. *Curr.Protoc.Chem.Biol.* **5**, 281-302.
- Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH (2003). Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J.Biol.Chem.* **278**, 44230-44237.
- Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schroder R (2013). Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* **125**, 47-75.
- Clemmons DR (2009). Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol.Metab.* **20**, 349-356.
- Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol.* **185**, 1083-1095.
- Cole RN and Hart GW (1999). Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions. *J.Neurochem.* **73**, 418-428.
- Comer FI and Hart GW (1999). O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochim.Biophys.Acta.* **1473**, 161-171.
- Comer FI and Hart GW (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry.* **40**, 7845-7852.
- Comtesse N, Maldener E, Meese E (2001). Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **283**, 634-640.
- Conti A, Gorza L, Sorrentino V (1996). Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. *Biochem.J.* **316 (Pt 1)**, 19-23.
- Cooper TA and Ordahl CP (1984). A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science.* **226**, 979-982.
- Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* **295**, E17-E28.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS (2004). Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz.J Med.Biol Res.* **37**, 1819-1830.
- Cox D, Carver JA, Ecroyd H (2014). Preventing alpha-synuclein aggregation: the role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* **1842**, 1830-1843.

Bibliographie

- Cummins P and Perry SV (1973). The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem.J.* **133**, 765-777.
- Curatolo P and Moavero R (2012). mTOR Inhibitors in Tuberous Sclerosis Complex. *Curr.Neuropharmacol.* **10**, 404-415.
- D -
- Dai MS and Lu H (2008). Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J.Cell Biochem.* **105**, 670-677.
- Damer CK, Partridge J, Pearson WR, Haystead TA (1998). Rapid identification of protein phosphatase 1-binding proteins by mixed peptide sequencing and data base searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1. *J Biol Chem.* **273**, 24396-24405.
- Dassanayaka S and Jones SP (2014). O-GlcNAc and the cardiovascular system. *Pharmacol.Ther.* **142**, 62-71.
- Datta S, Malhotra L, Dickerson R, Chaffee S, Sen CK, Roy S (2015). Laser capture microdissection: Big data from small samples. *Histol.Histopathol.* 11622-
- Dayon L, Hainard A, Licker V, Turck N, Kuhn K, Hochstrasser DF, Burkhard PR, Sanchez JC (2008). Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal.Chem.* **80**, 2921-2931.
- De Bock M, de SD, Meuwis MA, Chapelle JP, Louis E, Malaise M, Merville MP, Fillet M (2010). Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. *J Biomed.Biotechnol.* **2010**, 906082-
- Dehennaut V and Lefebvre T (2013). Proteomics and PUGNAcity will overcome questioning of insulin resistance induction by nonselective inhibition of O-GlcNAcase. *Proteomics.* **13**, 2944-2946.
- Dehennaut V, Leprince D, Lefebvre T (2014). O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front Endocrinol.(Lausanne).* **5**, 155-
- Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jesus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T (2008). Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol.Cell Proteomics.* **7**, 2229-2245.
- Delp MD and Duan C (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl.Physiol (1985.)*. **80**, 261-270.
- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **105**, 10762-10767.
- Deracinois B, Camoin L, Audebert S, Dupont E, Bastide B, Cieniewski-Bernard C (2015a). Click Chemistry as a powerful tools for identification of O-GlcNAcylated sites. *in redaction for submission in Mol Cell Proteomics.*
- Deracinois B, Duban-Deweere S, Hachani Y, Dupont E, Bastide B, Cieniewski-Bernard C (2015b). Quantification of O-GlcNAc transferase using mass spectrometry. *in redaction for submission in Rapid Comm Mass Spec.*
- Derumeaux G, Mulder P, Richard V, Chagraoui A, Nafeh C, Bauer F, Henry JP, Thuillez C (2002). Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation.* **105**, 1602-1608.
- Desplanches D (1997). Structural and functional adaptations of skeletal muscle to weightlessness. *Int.J.Sports Med.* **18 Suppl 4**, S259-S264.

Bibliographie

- Desplanches D, Mayet MH, Ilyina-Kakueva EI, Frutoso J, Flandrois R (1991). Structural and metabolic properties of rat muscle exposed to weightlessness aboard Cosmos 1887. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol.* **63**, 288-292.
- Dhoot GK, Frearson N, Perry SV (1979). Polymorphic forms of troponin T and troponin C and their localization in striated muscle cell types. *Exp.Cell Res.* **122**, 339-350.
- Dias WB, Cheung WD, Wang Z, Hart GW (2009). Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *J.Biol.Chem.* **284**, 21327-21337.
- Dias WB and Hart GW (2007). O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol.Biosyst.* **3**, 766-772.
- Dong DL and Hart GW (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J.Biol.Chem.* **269**, 19321-19330.
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Blair DE, Pathak S, Navratilova I, van Aalten DM (2011). Substrate and product analogues as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Amino.Acids.* **40**, 781-792.
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DM (2006). GlcNAcstatin: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *J.Am.Chem.Soc.* **128**, 16484-16485.
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, van Aalten DM (2009). GlcNAcstatins are nanomolar inhibitors of human O-GlcNAcase inducing cellular hyper-O-GlcNAcylation. *Biochem.J.* **420**, 221-227.
- Drab T, Kracmerova J, Ticha I, Hanzlikova E, Ticha M, Liberda J (2011a). Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes. *J Sep.Sci.* **34**, 1692-1695.
- Drab T, Kracmerova J, Ticha I, Hanzlikova E, Ticha M, Ryslava H, Doubnerova V, Manaskova-Postlerova P, Liberda J (2011b). Native red electrophoresis--a new method suitable for separation of native proteins. *Electrophoresis.* **32**, 3597-3599.
- Drougat L, Olivier-Van SS, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste AS, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS (2012). Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim.Biophys.Acta.* **1820**, 1839-1848.
- Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J.Clin.Invest.* **113**, 115-123.
- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J.Clin.Invest.* **108**, 1341-1348.
- Dubois E, Fertin M, Burdese J, Amouyel P, Bauters C, Pinet F (2011a). Cardiovascular proteomics: translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling. *Proteomics Clin.Appl.* **5**, 57-66.
- Dubois E, Richard V, Mulder P, Lamblin N, Drobecq H, Henry JP, Amouyel P, Thuillez C, Bauters C, Pinet F (2011b). Decreased serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur.Heart J.* **32**, 115-123.
- Dubois-Deruy E, Belliard A, Mulder P, Bouvet M, Smet-Nocca C, Janel S, Lafont F, Beseme O, Amouyel P, Richard V, Pinet F (2015). Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosaminylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc.Res.* **107**, 56-65.
- Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP (1999). Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am.J.Hum.Genet.* **64**, 1127-1140.

Bibliographie

Dunlay SM and Roger VL (2012). Gender differences in the pathophysiology, clinical presentation, and outcomes of ischemic heart failure. *Curr.Heart Fail.Rep.* **9**, 267-276.

Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L (2011). Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* **300**, R408-R417.

- E -

Eaton P, Fuller W, Bell JR, Shattock MJ (2001). AlphaB crystallin translocation and phosphorylation: signal transduction pathways and preconditioning in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 1659-1671.

Ecroyd H, Meehan S, Horwitz J, Aquilina JA, Benesch JL, Robinson CV, Macphee CE, Carver JA (2007). Mimicking phosphorylation of alphaB-crystallin affects its chaperone activity. *Biochem.J.* **401**, 129-141.

Edgerton VR and Roy RR (1991). Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J Biomech.* **24 Suppl 1**, 123-133.

Egerman MA and Glass DJ (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev.Biochem.Mol Biol.* **49**, 59-68.

Ehler E and Gautel M (2008). The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv.Exp.Med.Biol.* **642**, 1-14.

El Ayed M, Bonnel D, Longuespee R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M (2010). MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Med.Sci.Monit.* **16**, BR233-BR245.

Elliott JL, Der PM, Prescott AR, Jansen KA, Koenderink GH, Quinlan RA (2013). The specificity of the interaction between alphaB-crystallin and desmin filaments and its impact on filament aggregation and cell viability. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **368**, 20120375-

Ellis RJ and Pinheiro TJ (2002). Medicine: danger--misfolding proteins. *Nature.* **416**, 483-484.

Emmott E and Goodfellow I (2014). Identification of protein interaction partners in mammalian cells using SILAC-immunoprecipitation quantitative proteomics. *J.Vis.Exp.*

Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH (1984). Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am.Coll.Cardiol.* **4**, 201-208.

- F -

Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W (2012). Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J.Cachexia.Sarcopenia.Muscle.* **3**, 163-179.

Farach AM and Galileo DS (2008). O-GlcNAc modification of radial glial vimentin filaments in the developing chick brain. *Brain Cell Biol.* **36**, 191-202.

Farah CS, Miyamoto CA, Ramos CH, da Silva AC, Quaggio RB, Fujimori K, Smillie LB, Reinach FC (1994). Structural and regulatory functions of the NH2- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J.Biol.Chem.* **269**, 5230-5240.

Fardini Y, Masson E, Boudah O, Ben JR, Cosson C, Pierre-Eugene C, Kuo MS, Issad T (2013). O-GlcNAcylation of FoxO1 in pancreatic beta cells promotes Akt inhibition through an IGFBP1-mediated autocrine mechanism. *FASEB J.*

Bibliographie

- Fardini Y, Perez-Cervera Y, Camoin L, Pagesy P, Lefebvre T, Issad T (2015). Regulatory O-GlcNAcylation sites on FoxO1 are yet to be identified. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **462**, 151-158.
- Feist P and Hummon AB (2015). Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *Int.J Mol Sci.* **16**, 3537-3563.
- Fey SJ and Larsen PM (2001). 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **5**, 26-33.
- Filiou MD, Martins-de-Souza D, Guest PC, Bahn S, Turck CW (2012). To label or not to label: applications of quantitative proteomics in neuroscience research. *Proteomics.* **12**, 736-747.
- Fitts RH, Brimmer CJ, Heywood-Cooksey A, Timmerman RJ (1989). Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *Am.J.Physiol.* **256**, C1082-C1091.
- Flicker PF, Phillips GN, Jr., Cohen C (1982). Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J.Mol.Biol.* **162**, 495-501.
- Fluck M and Hoppeler H (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **146**, 159-216.
- Forsythe ME, Love DC, Lazarus BD, Kim EJ, Prinz WA, Ashwell G, Krause MW, Hanover JA (2006). *Caenorhabditis elegans* ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**, 11952-11957.
- Fournier I, Wisztorski M, Salzet M (2008). Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert.Rev.Proteomics.* **5**, 413-424.
- Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, Vinatier D, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M (2009). MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics.* **8**, 2023-2033.
- Franck J, Longuespee R, Wisztorski M, van RA, Van ZR, Deelder A, Salzet M, McDonnell L, Fournier I (2010). MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. *Med.Sci.Monit.* **16**, BR293-BR299.
- Franck J, Quanico J, Wisztorski M, Day R, Salzet M, Fournier I (2013). Quantification-based mass spectrometry imaging of proteins by parafilm assisted microdissection. *Anal.Chem.* **85**, 8127-8134.
- Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N (2006). The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J.Mol.Med.(Berl).* **84**, 446-468.
- Frank E, Kessler MS, Filiou MD, Zhang Y, Maccarrone G, Reckow S, Bunck M, Heumann H, Turck CW, Landgraf R, Hamsch B (2009). Stable isotope metabolic labeling with a novel N-enriched bacteria diet for improved proteomic analyses of mouse models for psychopathologies. *PLoS.One.* **4**, e7821-
- Freire T, D'Alayer J, Bay S (2006). Efficient monitoring of enzymatic conjugation reaction by surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for process optimization. *Bioconjug.Chem.* **17**, 559-564.
- Frontera WR and Ochala J (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif.Tissue Int.* **96**, 183-195.
- Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M (1998). A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics.* **49**, 59-68.
- Fukuda N, Granzier HL, Ishiwata S, Kurihara S (2008). Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J.Physiol Sci.* **58**, 151-159.

Bibliographie

- Fulop N, Marchase RB, Chatham JC (2007a). Role of protein O-linked N-acetyl-glucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc.Res.* **73**, 288-297.
- Fulop N, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC (2007b). Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* **292**, H2227-H2236.

- 9 -

- Gahlmann R, Troutt AB, Wade RP, Gunning P, Kedes L (1987). Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T. *J.Biol.Chem.* **262**, 16122-16126.
- Galpin AJ, Raue U, Jemiolo B, Trappe TA, Harber MP, Minchev K, Trappe S (2012). Human skeletal muscle fiber type specific protein content. *Anal.Biochem.* **425**, 175-182.
- Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN (2006). Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett.* **580**, 3051-3058.
- Gannon J, Staunton L, O'Connell K, Doran P, Ohlendieck K (2008). Phosphoproteomic analysis of aged skeletal muscle. *Int.J.Mol.Med.* **22**, 33-42.
- Gao Y, Miyazaki J, Hart GW (2003). The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch.Biochem.Biophys.* **415**, 155-163.
- Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW (2001). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J.Biol.Chem.* **276**, 9838-9845.
- Gautel M (2011). The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr.Opin.Cell Biol.* **23**, 39-46.
- Geeves MA and Conibear PB (1995). The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys.J.* **68**, 194S-199S.
- Gelfi C, Vasso M, Cerretelli P (2011). Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *J.Proteomics.* **74**, 774-795.
- Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 6940-6945.
- Geuss U, Mayr GW, Heilmeyer LM, Jr. (1985). Steady-state kinetics of skeletal muscle myosin light chain kinase indicate a strong down regulation by products. *Eur.J Biochem.* **153**, 327-334.
- Gittings W, Huang J, Smith IC, Quadrilatero J, Vandenboom R (2011). The effect of skeletal myosin light chain kinase gene ablation on the fatigability of mouse fast muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* **31**, 337-348.
- Glass DJ (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int.J Biochem.Cell Biol.* **37**, 1974-1984.
- Gloster TM and Vocadlo DJ (2010). Mechanism, Structure, and Inhibition of O-GlcNAc Processing Enzymes. *Curr.Signal.Transduct.Ther.* **5**, 74-91.
- Gloster TM, Zandberg WF, Heinonen JE, Shen DL, Deng L, Vocadlo DJ (2011). Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat.Chem.Biol.* **7**, 174-181.
- Goldberg H, Whiteside C, Fantus IG (2011). O-linked beta-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* **301**, E713-E726.

Bibliographie

- Goldfarb LG and Dalakas MC (2009). Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J.Clin.Invest.* **119**, 1806-1813.
- Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P, Goldspink G (1986). The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Arch.* **407**, 333-340.
- Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF (2008). Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J.Anim Sci.* **86**, E19-E35.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003). The calpain system. *Physiol Rev.* **83**, 731-801.
- Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Kenneth NS, Goodfellow SJ, Athineos D, Zhang J, Ramsbottom BA, Innes F, Kantidakis T, Kerr ER, Brodie J, Grandori C, White RJ (2006). Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III. *Biochem.Soc.Symp.* 141-154.
- Gonzalez B, Negredo P, Hernando R, Manso R (2002). Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflugers Arch.* **443**, 377-386.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* **80**, 853-924.
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W (2009). 2-DE with IPGs. *Electrophoresis.* **30 Suppl 1**, S122-S132.
- Gouw JW, Krijgsveld J, Heck AJ (2010). Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol Cell Proteomics.* **9**, 11-24.
- Grabarek Z, Grabarek J, Leavis PC, Gergely J (1983). Cooperative binding to the Ca²⁺-specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J.Biol.Chem.* **258**, 14098-14102.
- Graham DR, Mitsak MJ, Elliott ST, Chen D, Whelan SA, Hart GW, Van Eyk JE (2008). Two-dimensional gel-based approaches for the assessment of N-Linked and O-GlcNAc glycosylation in human and simian immunodeficiency viruses. *Proteomics.* **8**, 4919-4930.
- Greaser ML and Gergely J (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J.Biol.Chem.* **246**, 4226-4233.
- Greaser ML and Gergely J (1973). Purification and properties of the components from troponin. *J.Biol.Chem.* **248**, 2125-2133.
- Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y (2014). Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Pflugers Arch.* **466**, 1199-1209.
- Gregorich ZR and Ge Y (2014). Top-down proteomics in health and disease: challenges and opportunities. *Proteomics.* **14**, 1195-1210.
- Greis KD, Zhou S, Burt TM, Carr AN, Dolan E, Easwaran V, Evdokimov A, Kawamoto R, Roesgen J, Davis GF (2006). MALDI-TOF MS as a label-free approach to rapid inhibitor screening. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* **17**, 815-822.
- Griffith LS and Schmitz B (1999). O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur.J.Biochem.* **262**, 824-831.
- Groves JA, Lee A, Yildirim G, Zachara NE (2013). Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress.Chaperones.* **18**, 535-558.
- Gu Y, Ande SR, Mishra S (2011). Altered O-GlcNAc modification and phosphorylation of mitochondrial proteins in myoblast cells exposed to high glucose. *Arch.Biochem.Biophys.* **505**, 98-104.
- Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, Lefebvre T (2004). 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **319**, 21-26.

Bibliographie

- Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, Lefebvre T (2008). Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J.* **22**, 2901-2911.
- Gundersen K (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.* **86**, 564-600.
- Guo B, Liang Q, Li L, Hu Z, Wu F, Zhang P, Ma Y, Zhao B, Kovacs AL, Zhang Z, Feng D, Chen S, Zhang H (2014). O-GlcNAc-modification of SNAP-29 regulates autophagosome maturation. *Nat.Cell Biol.* **16**, 1215-1226.
- Gurcel C, Vercoutter-Edouart AS, Fonbonne C, Mortuaire M, Salvador A, Michalski JC, Lemoine J (2008). Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging. *Anal.Bioanal.Chem.* **390**, 2089-2097.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat.Biotechnol.* **17**, 994-999.
- † -
- Hafen E (2004). Cancer, type 2 diabetes, and ageing: news from flies and worms. *Swiss.Med.Wkly.* **134**, 711-719.
- Hagmann J, Grob M, Burger MM (1992). The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *J Biol Chem.* **267**, 14424-14428.
- Hahne H and Kuster B (2011). A novel two-stage tandem mass spectrometry approach and scoring scheme for the identification of O-GlcNAc modified peptides. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* **22**, 931-942.
- Hahne H, Sobotzki N, Nyberg T, Helm D, Borodkin VS, van Aalten DM, Agnew B, Kuster B (2013). Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J.Proteome.Res.* **12**, 927-936.
- Hai CM and Gu Z (2006). Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling. *Eur.J.Cell Biol.* **85**, 305-309.
- Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J.Biol.Chem.* **267**, 9005-9013.
- Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J.Biol.Chem.* **273**, 3611-3617.
- Han I and Kudlow JE (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol.* **17**, 2550-2558.
- Han X, Jin M, Breuker K, McLafferty FW (2006). Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science.* **314**, 109-112.
- Han X, Sonoda T, Mori T, Yamanouchi G, Yamaji T, Shigaki S, Niidome T, Katayama Y (2010). Protein kinase substrate profiling with a high-density peptide microarray. *Comb.Chem.High Throughput.Screen.* **13**, 777-789.
- Hanke S, Besir H, Oesterhelt D, Mann M (2008). Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level. *J Proteome.Res.* **7**, 1118-1130.
- Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, Park MK (1987). O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J.Biol.Chem.* **262**, 9887-9894.

Bibliographie

- Hanover JA, Krause MW, Love DC (2010). The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim.Biophys.Acta.* **1800**, 80-95.
- Hanover JA, Krause MW, Love DC (2012). Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **13**, 312-321.
- Hardville S and Hart GW (2014). Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metab.* **20**, 208-213.
- Hart GW (2014). Three Decades of Research on O-GlcNAcylation - A Major Nutrient Sensor That Regulates Signaling, Transcription and Cellular Metabolism. *Front Endocrinol.(Lausanne).* **5**, 183-
- Hart GW and Akimoto Y (2009). The O-GlcNAc modification. *Essentials of Glycobiology, 2nd edition. Chapter 18*, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press-
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* **446**, 1017-1022.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011). Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu.Rev.Biochem.* **80**, 825-858.
- Hartner KT and Pette D (1990). Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur.J.Biochem.* **188**, 261-267.
- Harwood KR and Hanover JA (2014). Nutrient-driven O-GlcNAc cycling - think globally but act locally. *J.Cell Sci.* **127**, 1857-1867.
- Haslbeck M and Vierling E (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J.Mol.Biol.* **427**, 1537-1548.
- Hatsell S, Medina L, Merola J, Haltiwanger R, Cowin P (2003). Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J Biol Chem.* **278**, 37745-37752.
- He Y, Roth C, Turkenburg JP, Davies GJ (2014). Three-dimensional structure of a *Streptomyces sviveus* GNAT acetyltransferase with similarity to the C-terminal domain of the human GH84 O-GlcNAcase. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **70**, 186-195.
- Heal WP and Tate EW (2010). Getting a chemical handle on protein post-translational modification. *Org.Biomol.Chem.* **8**, 731-738.
- Hedou J, Bastide B, Page A, Michalski JC, Morelle W (2009). Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics.* **9**, 2139-2148.
- Hedou J, Cieniewski-Bernard C, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y, Bastide B (2007). O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* **282**, 10360-10369.
- Herrmann H and Aebi U (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12**, 79-90.
- Hinderlich S, Berger M, Schwarzkopf M, Effertz K, Reutter W (2000). Molecular cloning and characterization of murine and human N-acetylglucosamine kinase. *Eur.J.Biochem.* **267**, 3301-3308.
- Hinsby AM, Olsen JV, Mann M (2004). Tyrosine phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling: a role for insulin receptor substrate-4. *J.Biol.Chem.* **279**, 46438-46447.
- Hishiya A, Salman MN, Carra S, Kampinga HH, Takayama S (2011). BAG3 directly interacts with mutated alphaB-crystallin to suppress its aggregation and toxicity. *PLoS.One.* **6**, e16828-
- Hnia K, Ramsbacher C, Vermot J, Laporte J (2015). Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. *Cell Tissue Res.* **360**, 591-608.

Bibliographie

- Holmes KC (1996). Muscle proteins--their actions and interactions. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **6**, 781-789.
- Holmes KC and Geeves MA (2000). The structural basis of muscle contraction. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol Sci.* **355**, 419-431.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature.* **347**, 44-49.
- Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J.Cell Biol.* **104**, 1157-1164.
- Hoppeler H, Luthi P, Claassen H, Weibel ER, Howald H (1973). The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch.* **344**, 217-232.
- Houck SA, Landsbury A, Clark JI, Quinlan RA (2011). Multiple sites in alphaB-crystallin modulate its interactions with desmin filaments assembled in vitro. *PLoS.One.* **6**, e25859-
- Houdusse A and Cohen C (1996). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure.* **4**, 21-32.
- Hsu JL, Huang SY, Chow NH, Chen SH (2003). Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal.Chem.* **75**, 6843-6852.
- Hu LY, Ackermann MA, Kontogianni-Konstantopoulos A (2015). The sarcomeric M-region: a molecular command center for diverse cellular processes. *Biomed.Res.Int.* **2015**, 714197-
- Hu P, Shimoji S, Hart GW (2010). Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett.* **584**, 2526-2538.
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH (2009). Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J.Biol.Chem.* **284**, 547-555.
- Huang J and Manning BD (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem.J.* **412**, 179-190.
- Huang J and Manning BD (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem.Soc.Trans.* **37**, 217-222.
- Huang L, Wong TY, Lin RC, Furthmayr H (1999). Replacement of threonine 558, a critical site of phosphorylation of moesin in vivo, with aspartate activates F-actin binding of moesin. Regulation by conformational change. *J Biol Chem.* **274**, 12803-12810.
- Huang P, Ho SR, Wang K, Roessler BC, Zhang F, Hu Y, Bowe DB, Kudlow JE, Paterson AJ (2011). Muscle-specific overexpression of NCOATGK, splice variant of O-GlcNAcase, induces skeletal muscle atrophy. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **300**, C456-C465.
- Huang Q (2012). Ezrin/Radixin/Moesin Proteins in the Development of Diabetes and its Cardiovascular Complications. *J.Diabetes Metab.* 10.4172/2155-6156.S4-005-
- Huang X, Li J, Foster D, Lemanski SL, Dube DK, Zhang C, Lemanski LF (2002). Protein kinase C-mediated desmin phosphorylation is related to myofibril disarray in cardiomyopathic hamster heart. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*. **227**, 1039-1046.
- Huber B and Pette D (1996). Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. *Eur.J.Biochem.* **236**, 814-819.
- Hutchens TW and Yip TT (1993). New desorption strategies for the mass spectrometry analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **7**, 576-580.
- Huxley HE (1975). Proceedings: Structural basis of contraction in muscle. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* **356**, 377-

Bibliographie

Huxley HE and Hanson J (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*. **173**, 973-976.

- I -

Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T (2010). Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology*. **20**, 843-864.

Issaq HJ, Conrads TP, Prieto DA, Tirumalai R, Veenstra TD (2003). SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Anal.Chem.* **75**, 148A-155A.

Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D (2002). The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **292**, 587-592.

- J -

Jackman RW and Kandarian SC (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am.J Physiol Cell Physiol.* **287**, C834-C843.

Jackson PK and Eldridge AG (2002). The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol Cell.* **9**, 923-925.

Jackson SP and Tjian R (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* **55**, 125-133.

Jackson SP and Tjian R (1989). Purification and analysis of RNA polymerase II transcription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 1781-1785.

Jacobsen SE, Binkowski KA, Olszewski NE (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 9292-9296.

Janue A, Olive M, Ferrer I (2007). Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: a link between oxidative damage and abnormal protein aggregation. *Brain Pathol.* **17**, 377-388.

Ji L, Jayachandran G, Roth JA (2012). High throughput profiling of serum phosphoproteins/peptides using the SELDI-TOF-MS platform. *Methods Mol.Biol.* **818**, 199-216.

Ji S, Kang JG, Park SY, Lee J, Oh YJ, Cho JW (2011). O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino.Acids.* **40**, 809-818.

Jiang MS and Hart GW (1997). A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J.Biol.Chem.* **272**, 2421-2428.

Jinek M, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurralde E, Hanover JA, Conti E (2004). The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **11**, 1001-1007.

Joanne P, Chourbagi O, Agbulut O (2011). Desmin filaments and their disorganization associated with myofibrillar myopathies. *Biol.Aujourdhui.* **205**, 163-177.

Joanne P, Chourbagi O, Hourde C, Ferry A, Butler-Browne G, Vicart P, Dumonceaux J, Agbulut O (2013). Viral-mediated expression of desmin mutants to create mouse models of myofibrillar myopathy. *Skelet.Muscle.* **3**, 4-

Jones EA, Deininger SO, Hogendoorn PC, Deelder AM, McDonnell LA (2012). Imaging mass spectrometry statistical analysis. *J Proteomics.* **75**, 4962-4989.

Bibliographie

- Jones P, Cote RG, Martens L, Quinn AF, Taylor CF, Derache W, Hermjakob H, Apweiler R (2006). PRIDE: a public repository of protein and peptide identifications for the proteomics community. *Nucleic Acids Res.* **34**, D659-D663.
- Jones SP (2005). A bittersweet modification: O-GlcNAc and cardiac dysfunction. *Circ.Res.* **96**, 925-926.
- Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, Hart GW, Marban E (2008). Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation.* **117**, 1172-1182.
- Julka S and Regnier F (2004). Quantification in proteomics through stable isotope coding: a review. *J Proteome.Res.* **3**, 350-363.

- K -

- Kaasik K, Kivimae S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, Kissel H, Burlingame AL, Shokat KM, Ptacek LJ, Fu YH (2013). Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab.* **17**, 291-302.
- Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002). Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J.Biol.Chem.* **277**, 19229-19235.
- Kamm KE and Stull JT (2001). Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem.* **276**, 4527-4530.
- Kamm KE and Stull JT (2011). Signaling to myosin regulatory light chain in sarcomeres. *J Biol Chem.* **286**, 9941-9947.
- Kandarian SC and Jackman RW (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* **33**, 155-165.
- Kang JG, Park SY, Ji S, Jang I, Park S, Kim HS, Kim SM, Yook JI, Park YI, Roth J, Cho JW (2009). O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J.Biol.Chem.* **284**, 34777-34784.
- Kang JH, Toita R, Oishi J, Niidome T, Katayama Y (2007). Effect of the addition of diammonium citrate to alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix for the detection of phosphorylated peptide in phosphorylation reactions using cell and tissue lysates. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* **18**, 1925-1931.
- Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'tumba-Byn T, Pierre-Eugene C, Masson E, Hampe C, Issad T (2013). O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor alpha expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS.One.* **8**, e69150-
- Kawai M, Guth K, Winnikes K, Haist C, Ruegg JC (1987). The effect of inorganic phosphate on the ATP hydrolysis rate and the tension transients in chemically skinned rabbit psoas fibers. *Pflugers Arch.* **408**, 1-9.
- Kawano F, Fujita R, Nakai N, Terada M, Ohira T, Ohira Y (2012). HSP25 can modulate myofibrillar desmin cytoskeleton following the phosphorylation at Ser15 in rat soleus muscle. *J Appl.Physiol (1985).* **112**, 176-186.
- Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 18135-18140.

Bibliographie

- Keembiyehetty CN, Krzeslak A, Love DC, Hanover JA (2011). A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J.Cell Sci.* **124**, 2851-2860.
- Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J.Biol.Chem.* **268**, 10416-10424.
- Kelly WG and Hart GW (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell.* **57**, 243-251.
- Khidekel N, Arndt S, Lamarre-Vincent N, Lippert A, Poulin-Kerstien KG, Ramakrishnan B, Qasba PK, Hsieh-Wilson LC (2003). A chemoenzymatic approach toward the rapid and sensitive detection of O-GlcNAc posttranslational modifications. *J.Am.Chem.Soc.* **125**, 16162-16163.
- Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, Sun YE, Coon JJ, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2007). Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat.Chem.Biol.* **3**, 339-348.
- Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2004). Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**, 13132-13137.
- Kho AL, Perera S, Alexandrovich A, Gautel M (2012). The sarcomeric cytoskeleton as a target for pharmacological intervention. *Curr.Opin.Pharmacol.* **12**, 347-354.
- Kim EJ (2011). Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc. *Molecules.* **16**, 1987-2022.
- Kim EJ, Perreira M, Thomas CJ, Hanover JA (2006). An O-GlcNAcase-specific inhibitor and substrate engineered by the extension of the N-acetyl moiety. *J.Am.Chem.Soc.* **128**, 4234-4235.
- Kinoshita E and Kinoshita-Kikuta E (2011). Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics.* **11**, 319-323.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2009). Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat.Protoc.* **4**, 1513-1521.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics.* **5**, 749-757.
- Kischel P (2000). Expression et rôle fonctionnel de la troponine C dans l'activité contractile, en conditions normales et après un épisode d'hypodynamie-hypokinésie. *Thèse d'Université, Université de Lille 1.* p.194-
- Kischel P, Bastide B, Muller M, Dubail F, Offredi F, Jin JP, Mounier Y, Martial J (2005). Expression and functional properties of four slow skeletal troponin T isoforms in rat muscles. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **289**, C437-C443.
- Kley RA, Maerkens A, Leber Y, Theis V, Schreiner A, van der Ven PF, Uszkoreit J, Stephan C, Eulitz S, Euler N, Kirschner J, Muller K, Meyer HE, Tegenthoff M, Furst DO, Vorgerd M, Muller T, Marcus K (2013). A combined laser microdissection and mass spectrometry approach reveals new disease relevant proteins accumulating in aggregates of filaminopathy patients. *Mol.Cell Proteomics.* **12**, 215-227.
- Klug GA, Botterman BR, Stull JT (1982). The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *J Biol Chem.* **257**, 4688-4690.
- Knoll R, Buyandelger B, Lab M (2011). The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *J.Biomed.Biotechnol.* **2011**, 569628-
- Kocher T, Pichler P, Schutzbier M, Stingl C, Kaul A, Teucher N, Hasenfuss G, Penninger JM, Mechtler K (2009). High precision quantitative proteomics using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: a new mass spectrometric method combining the benefits of all. *J Proteome.Res.* **8**, 4743-4752.
- Kondo N and Nishimura S (2009). MALDI-TOF mass-spectrometry-based versatile method for the characterization of protein kinases. *Chemistry.* **15**, 1413-1421.

Bibliographie

- Konrad RJ, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE (2002). Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **293**, 207-212.
- Kontrogianni-Konstantopoulos A, Ackermann MA, Bowman AL, Yap SV, Bloch RJ (2009). Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol Rev.* **89**, 1217-1267.
- Kotter S, Andresen C, Kruger M (2014a). Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control. *Biol.Chem.* **395**, 1341-1352.
- Kotter S, Unger A, Hamdani N, Lang P, Vorgerd M, Nagel-Steger L, Linke WA (2014b). Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins. *J Cell Biol.* **204**, 187-202.
- Koutakis P, Miserlis D, Myers SA, Kim JK, Zhu Z, Papoutsi E, Swanson SA, Haynatzki G, Ha DM, Carpenter LA, McComb RD, Johanning JM, Casale GP, Pipinos II (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. *J.Histochem.Cytochem.* **63**, 256-269.
- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J.Biol.Chem.* **272**, 9308-9315.
- Kreppel LK and Hart GW (1999). Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J.Biol.Chem.* **274**, 32015-32022.
- Krishnamoorthy V, Donofrio AJ, Martin JL (2013). O-GlcNAcylation of alphaB-crystallin regulates its stress-induced translocation and cytoprotection. *Mol Cell Biochem.* **379**, 59-68.
- Kroner Z (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern.Med.Rev.* **14**, 373-379.
- Kruger M and Linke WA (2011). The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **286**, 9905-9912.
- Krzeslak A, Jozwiak P, Lipinska A (2011). Down-regulation of beta-N-acetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncol.Rep.* **26**, 743-749.
- Ku NO and Omary MB (1995). Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J.Biol.Chem.* **270**, 11820-11827.
- Kumar A, Singh PK, Parihar R, Dwivedi V, Lakhota SC, Ganesh S (2014). Decreased O-linked GlcNAcylation protects from cytotoxicity mediated by huntingtin exon1 protein fragment. *J.Biol.Chem.* **289**, 13543-13553.
- Kwak TK, Kim H, Jung O, Lee SA, Kang M, Kim HJ, Park JM, Kim SH, Lee JW (2010). Glucosamine treatment-mediated O-GlcNAc modification of paxillin depends on adhesion state of rat insulinoma INS-1 cells. *J.Biol.Chem.* **285**, 36021-36031.

- L -

- Labeit S, Kolmerer B, Linke WA (1997). The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ.Res.* **80**, 290-294.
- Labokha AA, Gradmann S, Frey S, Hulsmann BB, Urlaub H, Baldus M, Gorlich D (2013). Systematic analysis of barrier-forming FG hydrogels from *Xenopus* nuclear pore complexes. *EMBO J.* **32**, 204-218.
- Laczy B, Hill BG, Wang K, Paterson AJ, White CR, Xing D, Chen YF, Darley-Usmar V, Oparil S, Chatham JC (2009). Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* **296**, H13-H28.

Bibliographie

- Laczy B, Marsh SA, Brocks CA, Wittmann I, Chatham JC (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. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* **299**, H1715-H1727.
- Laing NG and Nowak KJ (2005). When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease. *Bioessays.* **27**, 809-822.
- Lambert M, Richard E, Duban-Deweere S, Krzewinski F, Deracinois B, Dupont E, Bastide B, Cieniewski-Bernard C (2015a). O-GlcNAcylation is a key modulator of skeletal muscle sarcomeric morphometry through modulation of protein-protein interactions. *Revised J Biol Chem.*
- Lambert M, Richard E, Duban-Deweere S, Krzewinski F, Deracinois B, Dupont E, Bastide B, Cieniewski-Bernard C (2015b). O-GlcNAcylation modulates sarcomeric organization and protein-protein interactions in C2C12 myotubes. *J Muscle Cell Res Motil.* **36**, 73-
- Lange S, Ehler E, Gautel M (2006). From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol.* **16**, 11-18.
- Larance M and Lamond AI (2015). Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat.Rev.Mol Cell Biol.* **16**, 269-280.
- Lawler JM, Song W, Demaree SR (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic.Biol.Med.* **35**, 9-16.
- Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2006). Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology.* **16**, 415-421.
- Lazarus MB, Jiang J, Kapuria V, Bhuiyan T, Janetzko J, Zandberg WF, Vocadlo DJ, Herr W, Walker S (2013). HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science.* **342**, 1235-1239.
- Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S (2011). Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature.* **469**, 564-567.
- Leavy TM and Bertozzi CR (2007). A high-throughput assay for O-GlcNAc transferase detects primary sequence preferences in peptide substrates. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **17**, 3851-3854.
- Leberer E and Pette D (1986). Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. *Eur.J.Biochem.* **156**, 489-496.
- Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, Caillet-Boudin ML, Michalski JC (1999). Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim.Biophys.Acta.* **1472**, 71-81.
- Lefebvre T, Baert F, Bodart JF, Flament S, Michalski JC, Vilain JP (2004a). Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J.Cell Biochem.* **93**, 999-1010.
- Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, Drougat L, Mir AM, Mortuaire M, Vercoutter-Edouart AS, Michalski JC (2010). Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim.Biophys.Acta.* **1800**, 67-79.
- Lefebvre T, Drougat L, Olivier-Van SS, Michalski JC, Vercoutter-Edouart AS (2013). Antibodies and activity measurements for the detection of O-GlcNAc transferase and assay of its substrate, UDP-GlcNAc. *Methods Mol.Biol.* **1022**, 147-159.
- Lefebvre T, Pinte S, Guerardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny MC, Michalski JC, Leprince D (2004b). The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur.J.Biochem.* **271**, 3843-3854.
- Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Goring HH, Duggirala R, Blangero J, Konrad RJ, Stern MP (2005). A single

Bibliographie

- nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*. **54**, 1214-1221.
- Levine BA, Moir AJ, Perry SV (1988). The interaction of troponin-I with the N-terminal region of actin. *Eur.J.Biochem*. **172**, 389-397.
- Levine RJ, Kensler RW, Yang Z, Stull JT, Sweeney HL (1996). Myosin light chain phosphorylation affects the structure of rabbit skeletal muscle thick filaments. *Biophys.J.* **71**, 898-907.
- Levine RJ, Yang Z, Epstein ND, Fananapazir L, Stull JT, Sweeney HL (1998). Structural and functional responses of mammalian thick filaments to alterations in myosin regulatory light chains. *J Struct.Biol.* **122**, 149-161.
- Lewis BA and Hanover JA (2014). O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression. *J.Biol.Chem.* **289**, 34440-34448.
- Li SY, Sigmon VK, Babcock SA, Ren J (2007). Advanced glycation endproduct induces ROS accumulation, apoptosis, MAP kinase activation and nuclear O-GlcNAcylation in human cardiac myocytes. *Life Sci.* **80**, 1051-1056.
- Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem.Sci.* **29**, 32-38.
- Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE, Babinet C, Paulin D (1997). Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J.Cell Biol.* **139**, 129-144.
- Liao L, McClatchy DB, Park SK, Xu T, Lu B, Yates JR, III (2008). Quantitative analysis of brain nuclear phosphoproteins identifies developmentally regulated phosphorylation events. *J Proteome.Res.* **7**, 4743-4755.
- Linke WA and Kruger M (2010). The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways. *Physiology.(Bethesda.)*. **25**, 186-198.
- Liu C (2011). The application of SELDI-TOF-MS in clinical diagnosis of cancers. *J Biomed.Biotechnol.* **2011**, 245821-
- Liu GD, Xu C, Feng L, Wang F (2015). The augmentation of O-GlcNAcylation reduces glyoxal-induced cell injury by attenuating oxidative stress in human retinal microvascular endothelial cells. *Int.J.Mol.Med.* **36**, 1019-1027.
- Liu J, Cai Y, Wang J, Zhou Q, Yang B, Lu Z, Jiao L, Zhang D, Sui S, Jiang Y, Ying W, Qian X (2007a). Phosphoproteome profile of human liver Chang's cell based on 2-DE with fluorescence staining and MALDI-TOF/TOF-MS. *Electrophoresis.* **28**, 4348-4358.
- Liu J, Marchase RB, Chatham JC (2007b). Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* **293**, H1391-H1399.
- Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB (2006a). Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J.Mol.Cell Cardiol.* **40**, 303-312.
- Liu J, Yu Y, Fan YZ, Chang H, Liu HM, Cui Y, Chen Q, Wang R (2005). Cardiovascular effects of endomorphins in alloxan-induced diabetic rats. *Peptides.* **26**, 607-614.
- Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 2820-2825.
- Liu L, Ghosh JG, Clark JI, Jiang S (2006b). Studies of alphaB crystallin subunit dynamics by surface plasmon resonance. *Anal.Biochem.* **350**, 186-195.

Bibliographie

- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA (2005). **3e éd. biologie moléculaire de la cellule. De Boeck,**
- Longuespee R, Fleron M, Pottier C, Quesada-Calvo F, Meuwis MA, Baiwir D, Smargiasso N, Mazzucchelli G, De Pauw-Gillet MC, Delvenne P, De PE (2014). Tissue proteomics for the next decade? Towards a molecular dimension in histology. *OMICS*. **18**, 539-552.
- Longuespee R, Gagnon H, Boyon C, Strupat K, Dauly C, Kerdraon O, Ighodaro A, Desmons A, Dupuis J, Wisztorski M, Vinatier D, Fournier I, Day R, Salzet M (2013). Proteomic analyses of serous and endometrioid epithelial ovarian cancers - cases studies - molecular insights of a possible histological etiology of serous ovarian cancer. *Proteomics Clin.Appl.* **7**, 337-354.
- Loscalzo J (2003). Proteomics in cardiovascular biology and medicine. *Circulation*. **108**, 380-383.
- Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, Baker H (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J.Mol.Biol.* **42**, 1-29.
- Lowey S, Waller GS, Trybus KM (1993). Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening. *Nature*. **365**, 454-456.
- Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA (1997). O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J.Biol.Chem.* **272**, 9316-9324.
- Lundgren DH, Hwang SI, Wu L, Han DK (2010). Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert.Rev.Proteomics*. **7**, 39-53.
- Lynch GS, Schertzer JD, Ryall JG (2007). Therapeutic approaches for muscle wasting disorders. *Pharmacol.Ther.* **113**, 461-487.

- M -

- Ma J and Hart GW (2013). Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert.Rev.Proteomics*. **10**, 365-380.
- Ma J and Hart GW (2014). O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin.Proteomics*. **11**, 8-
- Ma Z and Vosseller K (2014). Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling. *J.Biol.Chem.* **289**, 34457-34465.
- Ma ZY, Skorobogatko Y, Vosseller K (2013). Tandem lectin weak affinity chromatography for glycoprotein enrichment. *Methods Mol.Biol.* **951**, 21-31.
- Macauley MS and Vocadlo DJ (2009). Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydr.Res.* **344**, 1079-1084.
- Macauley MS and Vocadlo DJ (2010). Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase. *Biochim.Biophys.Acta.* **1800**, 107-121.
- Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ (2005). O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J.Biol.Chem.* **280**, 25313-25322.
- MacIntosh BR (2003). Role of calcium sensitivity modulation in skeletal muscle performance. *News Physiol Sci.* **18**, 222-225.
- MacLennan DH, Rice WJ, Green NM (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J.Biol.Chem.* **272**, 28815-28818.
- Maerkens A, Kley RA, Olive M, Theis V, van der Ven PF, Reimann J, Milting H, Schreiner A, Uszkoreit J, Eisenacher M, Barkovits K, Guttsches AK, Tonillo J, Kuhlmann K, Meyer HE, Schroder R, Tegenthoff M, Furst DO, Muller T, Goldfarb LG, Vorgerd M, Marcus K (2013). Differential proteomic analysis of abnormal intramyoplasmic aggregates in desminopathy. *J.Proteomics*. **90**, 14-27.

Bibliographie

- Malnic B and Reinach FC (1994). Assembly of functional skeletal muscle troponin complex in *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* **222**, 49-54.
- Manchester JK, Chi MM, Norris B, Ferrier B, Krasnov I, Nemeth PM, McDougal DB, Jr., Lowry OH (1990). Effect of microgravity on metabolic enzymes of individual muscle fibers. *FASEB J.* **4**, 55-63.
- Manning DR and Stull JT (1982). Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Am.J Physiol.* **242**, C234-C241.
- Maronedze C, Lilley K, Thomas L (2013). Comparative gel-based phosphoproteomics in response to signaling molecules. *Methods Mol.Biol.* **1016**, 139-154.
- Marsh SA, Collins HE, Chatham JC (2014). Protein O-GlcNAcylation and cardiovascular (patho)physiology. *J.Biol.Chem.* **289**, 34449-34456.
- Marsh SA, Powell PC, Dell'italia LJ, Chatham JC (2012). Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life Sci.*
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991). Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J.Biol.Chem.* **266**, 4706-4712.
- Martens L, Hermjakob H, Jones P, Adamski M, Taylor C, States D, Gevaert K, Vandekerckhove J, Apweiler R (2005). PRIDE: the proteomics identifications database. *Proteomics.* **5**, 3537-3545.
- Martin BR, Wang C, Adibekian A, Tully SE, Cravatt BF (2012). Global profiling of dynamic protein palmitoylation. *Nat.Methods.* **9**, 84-89.
- Martins-de-Souza D, Menezes de OB, dos Santos FA, Horiuchi RS, Crepaldi DC, de PE, Marangoni S, Gattaz WF, Dias-Neto E, Camillo NJ (2007). The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.* **6**, 70-75.
- Maruyama K, Kimura S, Ohashi K, Kuwano Y (1981). Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J.Biochem.* **89**, 701-709.
- Matthews JA, Acevedo-Duncan M, Potter RL (2005). Selective decrease of membrane-associated PKC-alpha and PKC-epsilon in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells. *Biochim.Biophys.Acta.* **1743**, 305-315.
- McClain DA (2002). Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications.* **16**, 72-80.
- McClain DA and Crook ED (1996). Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes.* **45**, 1003-1009.
- McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, Hanover JA (2002). Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 10695-10699.
- McClung JM, Judge AR, Talbert EE, Powers SK (2009). Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **296**, C363-C371.
- McDonald KS, Blaser CA, Fitts RH (1994). Force-velocity and power characteristics of rat soleus muscle fibers after hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol (1985.)*. **77**, 1609-1616.
- McDonald KS and Fitts RH (1995). Effect of hindlimb unloading on rat soleus fiber force, stiffness, and calcium sensitivity. *J Appl.Physiol (1985.)*. **79**, 1796-1802.
- McDonnell LA, Corthals GL, Willems SM, van RA, van Zeijl RJ, Deelder AM (2010). Peptide and protein imaging mass spectrometry in cancer research. *J Proteomics.* **73**, 1921-1944.
- McLean K, Wu Y, Gan BS, O'Gorman DB (2009). An alternative kinase activity assay for primary cultures derived from clinical isolates. *Clin.Invest Med.* **32**, E84-E94.

Bibliographie

- Meding S, Balluff B, Elsner M, Schone C, Rauser S, Nitsche U, Maak M, Schafer A, Hauck SM, Ueffing M, Langer R, Hofler H, Friess H, Rosenberg R, Walch A (2012). Tissue-based proteomics reveals FXYD3, S100A11 and GSTM3 as novel markers for regional lymph node metastasis in colon cancer. *J Pathol.* **228**, 459-470.
- Megger DA, Bracht T, Meyer HE, Sitek B (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochim.Biophys.Acta.* **1834**, 1581-1590.
- Mehdy A, Morelle W, Rosnoblet C, Legrand D, Lefebvre T, Duvet S, Foulquier F (2012). PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells. *J.Biochem.* **151**, 439-446.
- Metzger JM, Greaser ML, Moss RL (1989). Variations in cross-bridge attachment rate and tension with phosphorylation of myosin in mammalian skinned skeletal muscle fibers. Implications for twitch potentiation in intact muscle. *J Gen.Physiol.* **93**, 855-883.
- Meyer LC and Wright NT (2013). Structure of giant muscle proteins. *Front Physiol.* **4**, 368-
- Miernyk JA and Thelen JJ (2008). Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J.* **53**, 597-609.
- Mieulet V and Lamb RF (2010). Tuberous sclerosis complex: linking cancer to metabolism. *Trends Mol.Med.* **16**, 329-335.
- Millar NC and Homsher E (1992). Kinetics of force generation and phosphate release in skinned rabbit soleus muscle fibers. *Am.J.Physiol.* **262**, C1239-C1245.
- Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Zubarev RA (1999). Localization of O-glycosylation sites in peptides by electron capture dissociation in a Fourier transform mass spectrometer. *Anal.Chem.* **71**, 4431-4436.
- Mishra S, Ande SR, Salter NW (2011). O-GlcNAc modification: why so intimately associated with phosphorylation? *Cell Commun.Signal.* **9**, 1-
- Miyazaki M and Esser KA (2009). REDD2 is enriched in skeletal muscle and inhibits mTOR signaling in response to leucine and stretch. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **296**, C583-C592.
- Mizusawa H, Takagi A, Sugita H, Toyokura Y (1982). Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. *J.Biochem.* **91**, 423-425.
- Moore RL and Stull JT (1984). Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am.J Physiol.* **247**, C462-C471.
- Moorhead G, Johnson D, Morrice N, Cohen P (1998). The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett.* **438**, 141-144.
- Moradian A, Kalli A, Sweredoski MJ, Hess S (2014). The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. *Proteomics.* **14**, 489-497.
- Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ (1979). A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist.* **22**, S23-S24.
- Musacchia XJ and Deavers DR (1980). A new rat model for studies of hypokinesia and antiorthostasis. *Physiologist.* **23**, S91-S92.
- Muthuchamy M, Rethinasamy P, Wieczorek DF (1997). Tropomyosin structure and function new insights. *Trends Cardiovasc.Med.* **7**, 124-128.
- Mysoet J, Canu MH, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Dupont E (2014). Hypoactivity affects IGF-1 level and PI3K/AKT signaling pathway in cerebral structures implied in motor control. *PLoS.One.* **9**, e107631-

- N -

- Nagaraj RH, Nahomi RB, Mueller NH, Raghavan CT, Ammar DA, Petrash JM (2015). Therapeutic potential of alpha-crystallin. *Biochim.Biophys.Acta*.
- Nagel AK, Schilling M, Comte-Walters S, Berkaw MN, Ball LE (2013). Identification of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc)-modified osteoblast proteins by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry reveals proteins critical for bone formation. *Mol Cell Proteomics*. **12**, 945-955.
- Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, Aoki J (2000). Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J.Appl.Physiol (1985.)*. **88**, 359-363.
- Nakamura S, Nakano S, Nishii M, Kaneko S, Kusaka H (2012). Localization of O-GlcNAc-modified proteins in neuromuscular diseases. *Med.Mol.Morphol*. **45**, 86-90.
- Nandi A, Sprung R, Barma DK, Zhao Y, Kim SC, Falck JR, Zhao Y (2006). Global identification of O-GlcNAc-modified proteins. *Anal.Chem*. **78**, 452-458.
- Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC, Haynes PA (2011). Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. **11**, 535-553.
- Ngoh GA and Jones SP (2008). New insights into metabolic signaling and cell survival: the role of beta-O-linkage of N-acetylglucosamine. *J.Pharmacol.Exp.Ther*. **327**, 602-609.
- Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M (2015). Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors.(Basel)*. **15**, 10481-10510.
- Nishikawa I, Nakajima Y, Ito M, Fukuchi S, Homma K, Nishikawa K (2010). Computational prediction of O-linked glycosylation sites that preferentially map on intrinsically disordered regions of extracellular proteins. *Int.J.Mol.Sci*. **11**, 4991-5008.
- Nolte D and Muller U (2002). Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm.Genome*. **13**, 62-64.

- O -

- O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ (1996). Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J.Pathol*. **178**, 176-181.
- O'Farrell PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. **250**, 4007-4021.
- O'Farrell PH (2008). The pre-omics era: the early days of two-dimensional gels. *Proteomics*. **8**, 4842-4852.
- Obermann WM, Gautel M, Weber K, Furst DO (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. *EMBO J*. **16**, 211-220.
- Oddoux S (2009). Fonctions des triadines dans le muscle squelettique. Caractérisation de l'isoforme Trisk 32. *Cellular Biology.Université Joseph-Fourier - Grenoble I*. <tel-00443078>.
- Ogawa M, Furukawa K, Okajima T (2014). Extracellular O-linked beta-N-acetylglucosamine: Its biology and relationship to human disease. *World J.Biol.Chem*. **5**, 224-230.
- Olive M (2009). Extralysosomal protein degradation in myofibrillar myopathies. *Brain Pathol*. **19**, 507-515.

Bibliographie

- Olive M, Armstrong J, Miralles F, Pou A, Fardeau M, Gonzalez L, Martinez F, Fischer D, Martinez Matos JA, Shatunov A, Goldfarb L, Ferrer I (2007). Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene. *Neuromuscul.Disord.* **17**, 443-450.
- Olive M, Odgerel Z, Martinez A, Poza JJ, Bragado FG, Zabalza RJ, Jerico I, Gonzalez-Mera L, Shatunov A, Lee HS, Armstrong J, Maravi E, Arroyo MR, Pascual-Calvet J, Navarro C, Paradis C, Huerta M, Marquez F, Rivas EG, Pou A, Ferrer I, Goldfarb LG (2011). Clinical and myopathological evaluation of early- and late-onset subtypes of myofibrillar myopathy. *Neuromuscul.Disord.* **21**, 533-542.
- Oliveira BM, Coorsen JR, Martins-de-Souza D (2014). 2DE: the phoenix of proteomics. *J Proteomics.* **104**, 140-150.
- Olivier-Van Stichelen S., Dehennaut V, Buzy A, Zachayus JL, Guinez C, Mir AM, El Yazidi-Belkoura I, Copin MC, Boureme D, Loyaux D, Ferrara P, Lefebvre T (2014). O-GlcNAcylation stabilizes beta-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* **28**, 3325-3338.
- Olsen JV and Mann M (2013). Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol.Cell Proteomics.* **12**, 3444-3452.
- Olsen JV, Vermeulen M, Santamaria A, Kumar C, Miller ML, Jensen LJ, Gnad F, Cox J, Jensen TS, Nigg EA, Brunak S, Mann M (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci.Signal.* **3**, ra3-
- Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D (1998). Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell.Biochem.* **31**, 105-140.
- Ong SE (2012). The expanding field of SILAC. *Anal.Bioanal.Chem.* **404**, 967-976.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* **1**, 376-386.
- Ong SE, Foster LJ, Mann M (2003). Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods.* **29**, 124-130.
- Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, Mitchell CA (2009). The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem.J.* **419**, 29-49.
- Overath T, Kuckelkorn U, Henklein P, Strehl B, Bonar D, Kloss A, Siele D, Kloetzel PM, Janek K (2012). Mapping of O-GlcNAc sites of 20 S proteasome subunits and Hsp90 by a novel biotin-cystamine tag. *Mol.Cell Proteomics.* **11**, 467-477.
- Ow SY, Cardona T, Taton A, Magnuson A, Lindblad P, Stensjo K, Wright PC (2008). Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from Nostoc sp. PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags. *J Proteome.Res.* **7**, 1615-1628.
- Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim.Biophys.Acta.* **1799**, 353-364.

- P -

- Padre RC and Stull JT (2000). Conformational requirements for Ca(2+)/calmodulin binding and activation of myosin light chain kinase. *FEBS Lett.* **472**, 148-152.
- Park J, Kwon H, Kang Y, Kim Y (2007). Proteomic analysis of O-GlcNAc modifications derived from streptozotocin and glucosamine induced beta-cell apoptosis. *J.Biochem.Mol.Biol.* **40**, 1058-1068.
- Park KS, Mohapatra DP, Misonou H, Trimmer JS (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science.* **313**, 976-979.

Bibliographie

- Park SY, Ryu J, Lee W (2005). O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp.Mol.Med.* **37**, 220-229.
- Parker L, Engel-Hall A, Drew K, Steinhardt G, Helseth DL, Jr., Jabon D, McMurry T, Angulo DS, Kron SJ (2008). Investigating quantitation of phosphorylation using MALDI-TOF mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* **43**, 518-527.
- Parker LL, Brueggemeier SB, Rhee WJ, Wu D, Kent SB, Kron SJ, Palecek SP (2006). Photocleavable peptide hydrogel arrays for MALDI-TOF analysis of kinase activity. *Analyst.* **131**, 1097-1104.
- Parmacek MS and Leiden JM (1991). Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation.* **84**, 991-1003.
- Pate E and Cooke R (1989). Addition of phosphate to active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke. *Pflugers Arch.* **414**, 73-81.
- Patel JR, Diffie GM, Moss RL (1996). Myosin regulatory light chain modulates the Ca²⁺ dependence of the kinetics of tension development in skeletal muscle fibers. *Biophys.J.* **70**, 2333-2340.
- Paulin D and Li Z (2004). Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp.Cell Res.* **301**, 1-7.
- Pekkurnaz G, Trinidad JC, Wang X, Kong D, Schwarz TL (2014). Glucose regulates mitochondrial motility via Milton modification by O-GlcNAc transferase. *Cell.* **158**, 54-68.
- Perrie WT, Smillie LB, Perry SB (1973). A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle. *Biochem.J.* **135**, 151-164.
- Perry SV and Cole HA (1974). Phosphorylation of troponin and the effects of interactions between the components of the complex. *Biochem.J.* **141**, 733-743.
- Persechini A, Stull JT, Cooke R (1985). The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J.Biol.Chem.* **260**, 7951-7954.
- Pette D (2001). Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J.Appl.Physiol (1985.)*. **90**, 1119-1124.
- Pette D and Staron RS (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* **116**, 1-76.
- Pfeffer MA and Braunwald E (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* **81**, 1161-1172.
- Pica EC, Kathirvel P, Pramono ZA, Lai PS, Yee WC (2008). Characterization of a novel S13F desmin mutation associated with desmin myopathy and heart block in a Chinese family. *Neuromuscul.Disord.* **18**, 178-182.
- Pichler P, Kocher T, Holzmann J, Mohring T, Ammerer G, Mechtler K (2011). Improved precision of iTRAQ and TMT quantification by an axial extraction field in an Orbitrap HCD cell. *Anal.Chem.* **83**, 1469-1474.
- Piechura H, Oeljeklaus S, Warscheid B (2012). SILAC for the study of mammalian cell lines and yeast protein complexes. *Methods Mol.Biol.* **893**, 201-221.
- Pilcher H (2006). Alzheimer's disease could be "type 3 diabetes". *Lancet Neurol.* **5**, 388-389.
- Pinet F (2013). Proteomic analysis of plasma of patients with left ventricular remodeling after myocardial infarction: usefulness of SELDI-TOF. *Methods Mol Biol.* **1000**, 201-207.
- Pinet F, Beseme O, Cieniewski-Bernard C, Drobecq H, Jourdain S, Lamblin N, Amouyel P, Bauters C (2008). Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics.* **8**, 1798-1808.

Bibliographie

- Potter JD and Gergely J (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* **250**, 4628-4633.
- Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp Physiol.* **288**, R337-R344.
- Prescher JA and Bertozzi CR (2005). Chemistry in living systems. *Nat.Chem Biol.* **1**, 13-21.
- Prescher JA and Bertozzi CR (2006). Chemical technologies for probing glycans. *Cell.* **126**, 851-854.
- Price SR (2003). Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **35**, 617-628.

- Q -

- R -

- Rabilloud T (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* **2**, 3-10.
- Rabilloud T (2009). Solubilization of proteins in 2DE: an outline. *Methods Mol.Biol.* **519**, 19-30.
- Rabilloud T (2014). Paleoproteomics explained to youngsters: how did the wedding of two-dimensional electrophoresis and protein sequencing spark proteomics on: Let there be light. *J.Proteomics.* **107C**, 5-12.
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* **18**, 307-316.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J.Proteomics.* **73**, 2064-2077.
- Ramakrishnan B and Qasba PK (2002). Structure-based design of beta 1,4-galactosyltransferase I (beta 4Gal-T1) with equally efficient N-acetylgalactosaminyltransferase activity: point mutation broadens beta 4Gal-T1 donor specificity. *J Biol Chem.* **277**, 20833-20839.
- Ramirez-Correa GA, Jin W, Wang Z, Zhong X, Gao WD, Dias WB, Vecoli C, Hart GW, Murphy AM (2008). O-linked GlcNAc modification of cardiac myofilament proteins: a novel regulator of myocardial contractile function. *Circ.Res.* **103**, 1354-1358.
- Ramirez-Correa GA, Ma J, Slawson C, Zeidan Q, Lugo-Fagundo NS, Xu M, Shen X, Gao WD, Caceres V, Chakir K, DeVine L, Cole R, Marchionni L, Paolucci N, Hart GW, Murphy AM (2015). Removal of Abnormal Myofilament O-GlcNAcylation Restores Ca²⁺ Sensitivity in Diabetic Cardiac Muscle. *Diabetes.*
- Rappaport L, Contard F, Samuel JL, Delcayre C, Marotte F, Tome F, Fardeau M (1988). Storage of phosphorylated desmin in a familial myopathy. *FEBS Lett.* **231**, 421-425.
- Rassier DE and MacIntosh BR (2000). Coexistence of potentiation and fatigue in skeletal muscle. *Braz.J.Med.Biol Res.* **33**, 499-508.
- Rayment I and Holden HM (1994). The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem.Sci.* **19**, 129-134.
- Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993a). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science.* **261**, 58-65.

Bibliographie

- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993b). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. **261**, 50-58.
- Rebeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF (2014). Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **48**, 28-38.
- Reddy VS and Reddy GB (2015). Emerging role for alphaB-crystallin as a therapeutic agent: pros and cons. *Curr.Mol.Med.* **15**, 47-61.
- Regnier FE, Riggs L, Zhang R, Xiong L, Liu P, Chakraborty A, Seeley E, Sioma C, Thompson RA (2002). Comparative proteomics based on stable isotope labeling and affinity selection. *J Mass Spectrom.* **37**, 133-145.
- Reiser PJ, Greaser ML, Moss RL (1992). Developmental changes in troponin T isoform expression and tension production in chicken single skeletal muscle fibres. *J.Physiol.* **449**, 573-588.
- Reisinger F, del-Toro N, Ternent T, Hermjakob H, Vizcaino JA (2015). Introducing the PRIDE Archive RESTful web services. *Nucleic Acids Res.* **43**, W599-W604.
- Rexach JE, Clark PM, Hsieh-Wilson LC (2008). Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat.Chem Biol.* **4**, 97-106.
- Rexach JE, Rogers CJ, Yu SH, Tao J, Sun YE, Hsieh-Wilson LC (2010). Quantification of O-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nat.Chem Biol.* **6**, 645-651.
- Reynolds KJ, Yao X, Fenselau C (2002). Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent. *J Proteome.Res.* **1**, 27-33.
- Ribeiro EA, Jr., Pinotsis N, Ghisleni A, Salmazo A, Konarev PV, Kostan J, Sjoblom B, Schreiner C, Polyansky AA, Gkoukoulia EA, Holt MR, Aachmann FL, Zagrovic B, Bordignon E, Pirker KF, Svergun DI, Gautel M, DjinoVIC-Carugo K (2014). The structure and regulation of human muscle alpha-actinin. *Cell.* **159**, 1447-1460.
- Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL, Mounier Y (2000). Effects of beta(2)-agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **278**, C582-C588.
- Rigbolt KT, Prokhorova TA, Akimov V, Henningsen J, Johansen PT, Kratchmarova I, Kassem M, Mann M, Olsen JV, Blagoev B (2011). System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci.Signal.* **4**, rs3-
- Ritz-Gold CJ, Cooke R, Blumenthal DK, Stull JT (1980). Light chain phosphorylation alters the conformation of skeletal muscle myosin. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **93**, 209-214.
- Robles-Flores M, Melendez L, Garcia W, Mendoza-Hernandez G, Lam TT, Castaneda-Patlan C, Gonzalez-Aguilar H (2008). Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochim.Biophys.Acta.* **1783**, 695-712.
- Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan MC, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P (2013). 2D gels still have a niche in proteomics. *J.Proteomics.* **88**, 4-13.
- Rompp A and Spengler B (2013). Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem.Cell Biol.* **139**, 759-783.
- Roquemore EP, Chou TY, Hart GW (1994). Detection of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on cytoplasmic and nuclear proteins. *Methods Enzymol.* **230**, 443-460.
- Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschlager M (2008). The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat.Res.* **659**, 284-292.

Bibliographie

- Ross H, Armstrong CG, Cohen P (2002). A non-radioactive method for the assay of many serine/threonine-specific protein kinases. *Biochem.J.* **366**, 977-981.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* **3**, 1154-1169.
- Rotty JD, Hart GW, Coulombe PA (2010). Stressing the role of O-GlcNAc: linking cell survival to keratin modification. *Nat.Cell Biol.* **12**, 847-849.
- Ruan HB, Nie Y, Yang X (2013a). Regulation of protein degradation by O-GlcNAcylation: crosstalk with ubiquitination. *Mol.Cell Proteomics.* **12**, 3489-3497.
- Ruan HB, Singh JP, Li MD, Wu J, Yang X (2013b). Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol.Metab.* **24**, 301-309.
- Ruse C and Chen E (2015). Discovery and Quantification in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteo.Gen.Res.* 10.14302/issn.2326-0793.jpgr-13-357-
- Ryder JW, Lau KS, Kamm KE, Stull JT (2007). Enhanced skeletal muscle contraction with myosin light chain phosphorylation by a calmodulin-sensing kinase. *J.Biol.Chem.* **282**, 20447-20454.
- Ryu IH and Do SI (2011). Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **408**, 52-57.

- S -

- Sadikot T, Hammond CR, Ferrari MB (2010). Distinct roles for telethonin N-versus C-terminus in sarcomere assembly and maintenance. *Dev.Dyn.* **239**, 1124-1135.
- Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP (1996). Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **39**, 1229-1236.
- Sakabe K, Wang Z, Hart GW (2010). Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **107**, 19915-19920.
- Sakaidani Y, Ichiyangi N, Saito C, Nomura T, Ito M, Nishio Y, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T (2012). O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **419**, 14-19.
- Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, Nadano D, Matsuda T, Furukawa K, Okajima T (2011). O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat.Commun.* **2**, 583-
- Sandri M (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology.(Bethesda.)*. **23**, 160-170.
- Sandri M (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **584**, 1411-1416.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* **117**, 399-412.
- Sanger JM and Sanger JW (2008). The dynamic Z bands of striated muscle cells. *Sci.Signal.* **1**, e37-
- Sasse J and Gallagher SR (2009). Staining proteins in gels. *Curr.Protoc.Mol.Biol.* **Chapter 10**, Unit-
- Saxon E and Bertozzi CR (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* **287**, 2007-2010.
- Saxon E and Bertozzi CR (2001). Chemical and biological strategies for engineering cell surface glycosylation. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**, 1-23.

Bibliographie

- Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S (2008). O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp.Cell Res.* **314**, 2774-2787.
- Schachat FH, Diamond MS, Brandt PW (1987). Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J.Mol.Biol.* **198**, 551-554.
- Schamel WW (2008). Two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Curr.Protoc.Cell Biol.* **Chapter 6**, Unit-
- Schiaffino S and Reggiani C (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* **91**, 1447-1531.
- Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics.* **5**, 4-15.
- Schroder R and Schoser B (2009). Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain Pathol.* **19**, 483-492.
- Schultz J and Pils B (2002). Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Lett.* **529**, 179-182.
- Schulze WX and Usadel B (2010). Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu.Rev.Plant Biol.* **61**, 491-516.
- Seema S, Krishnan M, Harith AK, Sahai K, Iyer SR, Arora V, Tripathi RP (2014). Laser ionization mass spectrometry in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol.Med.* **43**, 471-483.
- Seibert V, Ebert MP, Buschmann T (2005). Advances in clinical cancer proteomics: SELDI-ToF-mass spectrometry and biomarker discovery. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.* **4**, 16-26.
- Selcen D (2011). Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul.Disord.* **21**, 161-171.
- Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 5735-5739.
- Shen DL, Gloster TM, Yuzwa SA, Vocadlo DJ (2012). Insights into O-linked N-acetylglucosamine ([0-9]O-GlcNAc) processing and dynamics through kinetic analysis of O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase activity on protein substrates. *J.Biol.Chem.* **287**, 15395-15408.
- Shi J, Wu S, Dai CL, Li Y, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2012). Diverse regulation of AKT and GSK-3beta by O-GlcNAcylation in various types of cells. *FEBS Lett.* **586**, 2443-2450.
- Short R and Posch A (2011). Stain-free Approach for Western Blotting. Alternative to the Standard Blot Normalization Process. *Gen.Eng.Biotech.News.* **31**, 20.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC (2007). Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp.Cell Res.* **313**, 2098-2109.
- Sjoblom B, Salmazo A, Djinovic-Carugo K (2008). Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci.* **65**, 2688-2701.
- Slawson C, Copeland RJ, Hart GW (2010). O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem.Sci.* **35**, 547-555.
- Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW (2008). A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol.Biol.Cell.* **19**, 4130-4140.
- Smolka MB, Zhou H, Purkayastha S, Aebersold R (2001). Optimization of the isotope-coded affinity tag-labeling procedure for quantitative proteome analysis. *Anal.Biochem.* **297**, 25-31.
- Snider NT and Omary MB (2014). Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **15**, 163-177.

Bibliographie

- Soesanto YA, Luo B, Jones D, Taylor R, Gabrielsen JS, Parker G, McClain DA (2008). Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* **295**, E974-E980.
- Sonoda T, Shigaki S, Nagashima T, Okitsu O, Kita Y, Murata M, Katayama Y (2004). Mass-tag technology for monitoring of protein kinase activity using mass spectrometry. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **14**, 847-850.
- Spengler B, Hubert M, Kaufmann R (1994). MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe. *Proceedings in the 42th annual conference on mass spectrometry and allied topics*. Chicago, Illinois.-
- Sprung R, Nandi A, Chen Y, Kim SC, Barma D, Falck JR, Zhao Y (2005). Tagging-via-substrate strategy for probing O-GlcNAc modified proteins. *J.Proteome.Res.* **4**, 950-957.
- Squire JM, Al-Khayat HA, Knupp C, Luther PK (2005). Molecular architecture in muscle contractile assemblies. *Adv.Protein Chem.* **71**, 17-87.
- Srikanth B, Vaidya MM, Kalraiya RD (2010). O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *J.Biol.Chem.* **285**, 34062-34071.
- St John SM and Scott CH (2002). A prediction rule for left ventricular dilatation post-MI? *Eur.Heart J.* **23**, 509-511.
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Reed DW, Murray JD, Campos GE, Gordon SE (1998). Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem.Cell Biol.* **110**, 73-80.
- Starr CM and Hanover JA (1990). Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyzes O-linked N-acetylglucosamine addition in vitro. *J.Biol.Chem.* **265**, 6868-6873.
- Stauber J, Ayed ME, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I (2010). Specific MALDI-MSI: Tag-Mass. *Methods Mol Biol.* **656**, 339-361.
- Steffen JM and Musacchia XJ (1985). Effect of seven days of spaceflight on hindlimb muscle protein, RNA and DNA in adult rats. *Physiologist.* **28**, S221-S222.
- Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF (2003). Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics.* **3**, 1128-1144.
- Stevens L, Bastide B, Bozzo C, Mounier Y (2004). Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch.* **448**, 507-514.
- Stevens L, Bastide B, Hedou J, Cieniewski-Bernard C, Montel V, Cochon L, Dupont E, Mounier Y (2013). Potential regulation of human muscle plasticity by MLC2 post-translational modifications during bed rest and countermeasures. *Arch.Biochem.Biophys.* **540**, 125-132.
- Stevens L, Bastide B, Kischel P, Pette D, Mounier Y (2002). Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **282**, C1025-C1030.
- Stevens L, Firinga C, Gohlsch B, Bastide B, Mounier Y, Pette D (2000). Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* **279**, C1558-C1563.
- Stevens L, Mounier Y, Holy X (1993). Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am.J.Physiol.* **264**, R770-R776.
- Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, Pette D (1999). Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am.J.Physiol.* **277**, C1044-C1049.

Bibliographie

- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol.Cell.* **14**, 395-403.
- Stull JT, Kamm KE, Vandenboom R (2011). Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Arch.Biochem.Biophys.* **510**, 120-128.
- Sweeney HL, Bowman BF, Stull JT (1993). Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am.J.Physiol.* **264**, C1085-C1095.
- Sweeney HL and Stull JT (1986). Phosphorylation of myosin in permeabilized mammalian cardiac and skeletal muscle cells. *Am.J Physiol.* **250**, C657-C660.
- Sweeney HL and Stull JT (1990). 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.* **87**, 414-418.
- Switzar L, Giera M, Niessen WM (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *J Proteome.Res.* **12**, 1067-1077.
- Syska H, Wilkinson JM, Grand RJ, Perry SV (1976). The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem.J.* **153**, 375-387.
- Szczesna D (2003). Regulatory light chains of striated muscle myosin. Structure, function and malfunction. *Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.* **3**, 187-197.
- Szczesna D, Zhao J, Jones M, Zhi G, Stull J, Potter JD (2002). Phosphorylation of the regulatory light chains of myosin affects Ca²⁺ sensitivity of skeletal muscle contraction. *J.Appl.Physiol.* **92**, 1661-1670.
- Szczesna D, Zhao J, Potter JD (1996). The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. *J Biol Chem.* **271**, 5246-5250.
- T -
- Tai HC, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2004). Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *J.Am.Chem.Soc.* **126**, 10500-10501.
- Tajsharghi H (2008). Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. *Int.J.Mol.Sci.* **9**, 1259-1275.
- Takeda H, Kawasaki A, Takahashi M, Yamada A, Koike T (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of phosphorylated compounds using a novel phosphate capture molecule. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **17**, 2075-2081.
- Tang Z, Liang R, Zhao S, Wang R, Huang R, Li K (2014). CNN3 is regulated by microRNA-1 during muscle development in pigs. *Int.J.Biol.Sci.* **10**, 377-385.
- Tarrant MK, Rho HS, Xie Z, Jiang YL, Gross C, Culhane JC, Yan G, Qian J, Ichikawa Y, Matsuoka T, Zachara N, Etzkorn FA, Hart GW, Jeong JS, Blackshaw S, Zhu H, Cole PA (2012). Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. *Nat.Chem.Biol.*
- Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van DA, Rabilloud T (2003). A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. *Electrophoresis.* **24**, 1787-1794.
- Tate EW (2008). Recent advances in chemical proteomics: exploring the post-translational proteome. *J.Chem.Biol.* **1**, 17-26.
- Tawa NE, Odessey R, Goldberg AL (1997). Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin.Invest.* **100**, 197-203.

Bibliographie

- Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M, Dudenhoefter GA (1988). Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* (1985.). **65**, 1191-1195.
- Teo CF, Ingale S, Wolfert MA, Elsayed GA, Not LG, Chatham JC, Wells L, Boons GJ (2010). Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc. *Nat.Chem.Biol.* **6**, 338-343.
- Thelen JJ and Miernyk JA (2012). The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. *Biochem.J.* **444**, 169-181.
- Thomason DB, Biggs RB, Booth FW (1989). Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am.J.Physiol.* **257**, R300-R305.
- Thomason DB and Booth FW (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J.Appl.Physiol* (1985.). **68**, 1-12.
- Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal.Chem.* **75**, 1895-1904.
- Thulasiraman V, Wang Z, Katrekar A, Lomas L, Yip TT (2004). Simultaneous monitoring of multiple kinase activities by SELDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol.Biol.* **264**, 205-214.
- Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J.Biol.Chem.* **280**, 2847-2856.
- Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE (2004). Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J.Biol.Chem.* **279**, 53665-53673.
- Torres CR and Hart GW (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J.Biol.Chem.* **259**, 3308-3317.
- Trakselis MA, Alley SC, Ishmael FT (2005). Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics. *Bioconjug.Chem.* **16**, 741-750.
- Tran JC, Zamdborg L, Ahlf DR, Lee JE, Catherman AD, Durbin KR, Tipton JD, Vellaichamy A, Kellie JF, Li M, Wu C, Sweet SM, Early BP, Siuti N, LeDuc RD, Compton PD, Thomas PM, Kelleher NL (2011). Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. *Nature.* **480**, 254-258.
- Trinidad JC, Barkan DT, Gullledge BF, Thalhammer A, Sali A, Schoepfer R, Burlingame AL (2012). Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol.Cell Proteomics.* **11**, 215-229.
- Tripet B, Van Eyk JE, Hodges RS (1997). Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca²⁺-dependent regulation of muscle contraction. *J.Mol.Biol.* **271**, 728-750.
- Tskhovrebova L and Trinick J (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 679-689.
- Tskhovrebova L and Trinick J (2010). Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. *J.Biomed.Biotechnol.* **2010**, 612482-
- Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA (1996). The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 4459-4464.

- Vaidyanathan K, Durning S, Wells L (2014). Functional O-GlcNAc modifications: implications in molecular regulation and pathophysiology. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **49**, 140-163.
- Vaidyanathan K and Wells L (2014). Multiple tissue-specific roles for the O-GlcNAc post-translational modification in the induction of and complications arising from type II diabetes. *J.Biol.Chem.* **289**, 34466-34471.
- van Remoortere A, van Zeijl RJ, van den Oever N, Franck J, Longuespee R, Wisztorski M, Salzet M, Deelder AM, Fournier I, McDonnell LA (2010). MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue. *J Am.Soc.Mass Spectrom.* **21**, 1922-1929.
- van Riggelen RJ, Yetil A, Felsher DW (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat.Rev.Cancer.* **10**, 301-309.
- Vandekerckhove J, Bugaisky G, Buckingham M (1986). Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J.Biol.Chem.* **261**, 1838-1843.
- Vandenboom R, Grange RW, Houston ME (1995). Myosin phosphorylation enhances rate of force development in fast-twitch skeletal muscle. *Am.J Physiol.* **268**, C596-C603.
- Vasilescu J, Guo X, Kast J (2004). Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics.* **4**, 3845-3854.
- Vibert P and Cohen C (1988). Domains, motions and regulation in the myosin head. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **9**, 296-305.
- Viner RI, Zhang T, Second T, Zabrouskov V (2009). Quantification of post-translationally modified peptides of bovine alpha-crystallin using tandem mass tags and electron transfer dissociation. *J.Proteomics.* **72**, 874-885.
- Vizcaino JA, Cote RG, Csordas A, Dianas JA, Fabregat A, Foster JM, Griss J, Alpi E, Birim M, Contell J, O'Kelly G, Schoenegger A, Ovelleiro D, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Rios D, Wang R, Hermjakob H (2013). The PRoteomics IDentifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**, D1063-D1069.
- Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GLJ (2001). Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am.J Pathol.* **158**, 1491-1502.
- Vocadlo DJ, Hang HC, Kim EJ, Hanover JA, Bertozzi CR (2003). A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 9116-9121.
- von Nandelstadh P, Soliymani R, Baumann M, Carpen O (2011). Analysis of myotilin turnover provides mechanistic insight into the role of myotilinopathy-causing mutations. *Biochem.J.* **436**, 113-121.
- von Maltzahn MJ, Bentzinger CF, Rudnicki MA (2012). Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat.Cell Biol.* **14**, 186-191.
- Vorderwülbecke S, Cleverley S, Weinberger SR, Wiesner A (2005). Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip System. *Nat.Methods.* **2**, 393-395.
- Vosseller K, Hansen KC, Chalkley RJ, Trinidad JC, Wells L, Hart GW, Burlingame AL (2005). Quantitative analysis of both protein expression and serine / threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol. *Proteomics.* **5**, 388-398.
- Vosseller K, Trinidad JC, Chalkley RJ, Specht CG, Thalhammer A, Lynn AJ, Snedecor JO, Guan S, Medzihradsky KF, Maltby DA, Schoepfer R, Burlingame AL (2006). O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol.Cell Proteomics.* **5**, 923-934.

Bibliographie

Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**, 5313-5318.

- W -

Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Scholz C, Kelstrup CD, Young C, Nielsen ML, Olsen JV, Brakebusch C, Choudhary C (2012). Proteomic analyses reveal divergent ubiquitylation site patterns in murine tissues. *Mol.Cell Proteomics.* **11**, 1578-1585.

Wan M, Wu X, Guan KL, Han M, Zhuang Y, Xu T (2006). Muscle atrophy in transgenic mice expressing a human TSC1 transgene. *FEBS Lett.* **580**, 5621-5627.

Wang P and Hanover JA (2013). Nutrient-driven O-GlcNAc cycling influences autophagic flux and neurodegenerative proteotoxicity. *Autophagy.* **9**,

Wang S, Huang X, Sun D, Xin X, Pan Q, Peng S, Liang Z, Luo C, Yang Y, Jiang H, Huang M, Chai W, Ding J, Geng M (2012). Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. *PLoS.One.* **7**, e37427-

Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J (2003). AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ.Res.* **93**, 998-1005.

Wang Z, Gucek M, Hart GW (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **105**, 13793-13798.

Wang Z and Hart GW (2008). Glycomics approaches to study O-GlcNAcylation: protein identification, site-mapping and site-specific O-GlcNAc quantitation. *Clin.Proteomics.* **4**, 5-13.

Wang Z, Pandey A, Hart GW (2007). Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol.Cell Proteomics.* **6**, 1365-1379.

Wang Z, Park K, Comer F, Hsieh-Wilson LC, Saudek CD, Hart GW (2009). Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes. *Diabetes.* **58**, 309-317.

Wang Z, Udeshi ND, O'Malley M, Shabanowitz J, Hunt DF, Hart GW (2010a). Enrichment and site mapping of O-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* **9**, 153-160.

Wang Z, Udeshi ND, Slawson C, Compton PD, Sakabe K, Cheung WD, Shabanowitz J, Hunt DF, Hart GW (2010b). Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci.Signal.* **3**, ra2-

Warrick HM and Spudich JA (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annu.Rev.Cell Biol.* **3**, 379-421.

Weber A, Pennise CR, Fowler VM (1999). Tropomodulin increases the critical concentration of barbed end-capped actin filaments by converting ADP.P(i)-actin to ADP-actin at all pointed filament ends. *J.Biol.Chem.* **274**, 34637-34645.

Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Soderberg O (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert.Rev.Proteomics.* **7**, 401-409.

Weiss W and Gorg A (2008). Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol.Biol.* **424**, 35-42.

Bibliographie

- Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW (2002a). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J.Biol.Chem.* **277**, 1755-1761.
- Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW (2004). O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J.Biol.Chem.* **279**, 38466-38470.
- Wells L, Slawson C, Hart GW (2011). The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino.Acids.* **40**, 877-883.
- Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW (2002b). Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics.* **1**, 791-804.
- Whelan LC, Power KA, McDowell DT, Kennedy J, Gallagher WM (2008a). Applications of SELDI-MS technology in oncology. *J Cell Mol Med.* **12**, 1535-1547.
- Whelan SA, Dias WB, Thiruneelakantapillai L, Lane MD, Hart GW (2010). Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *J.Biol.Chem.* **285**, 5204-5211.
- Whelan SA, Lane MD, Hart GW (2008b). Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J.Biol.Chem.* **283**, 21411-21417.
- Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE (2006). Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology.* **16**, 551-563.
- Whiting A, Wardale J, Trinick J (1989). Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J.Mol.Biol.* **205**, 263-268.
- Wilkins M (1994). 2D electrophoresis: from protein maps to genomes. *First Siena Conference.*
- Wilkinson JM (1980). Troponin C from rabbit slow skeletal and cardiac muscle is the product of a single gene. *Eur.J Biochem.* **103**, 179-188.
- Willems SM, van RA, Van ZR, Deelder AM, McDonnell LA, Hogendoorn PC (2010). Imaging mass spectrometry of myxoid sarcomas identifies proteins and lipids specific to tumour type and grade, and reveals biochemical intratumour heterogeneity. *J Pathol.* **222**, 400-409.
- Winter DL, Paulin D, Mericskay M, Li Z (2014). Posttranslational modifications of desmin and their implication in biological processes and pathologies. *Histochem.Cell Biol.* **141**, 1-16.
- Wolfe RR (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am.J.Clin.Nutr.* **84**, 475-482.
- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR, III (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal.Chem.* **73**, 5683-5690.
- Wright GL, cazares LH, Leung SM, Nasim S, Adam BL, Yip TT, Schellhammer PF, Gong L, Vlahou A (1999). ProteinChip surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2**, 264-276.
- Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Matthews DE, Yates JR, III (2004). Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. *Anal.Chem.* **76**, 4951-4959.
- Wu D, Sylvester JE, Parker LL, Zhou G, Kron SJ (2010). Peptide reporters of kinase activity in whole cell lysates. *Biopolymers.* **94**, 475-486.
- Wu J, Lenchik NJ, Pabst MJ, Solomon SS, Shull J, Gerling IC (2005). Functional characterization of two-dimensional gel-separated proteins using sequential staining. *Electrophoresis.* **26**, 225-237.

Bibliographie

Wulfschuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF, III (2001). New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics*. **1**, 1205-1215.

- X -

Xie H, Vucetic S, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Dunker AK, Obradovic Z, Uversky VN (2007a). Functional anthology of intrinsic disorder. 3. Ligands, post-translational modifications, and diseases associated with intrinsically disordered proteins. *J.Proteome.Res.* **6**, 1917-1932.

Xie H, Vucetic S, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Dunker AK, Uversky VN, Obradovic Z (2007b). Functional anthology of intrinsic disorder. 1. Biological processes and functions of proteins with long disordered regions. *J.Proteome.Res.* **6**, 1882-1898.

Xing D, Feng W, Not LG, Miller AP, Zhang Y, Chen YF, Majid-Hassan E, Chatham JC, Oparil S (2008). Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* **295**, H335-H342.

- Y -

Yang S, Zou LY, Bounelis P, Chaudry I, Chatham JC, Marchase RB (2006a). Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock*. **25**, 600-607.

Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW (2006b). Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat.Cell Biol.* **8**, 1074-1083.

Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM (2008). Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. **451**, 964-969.

Yang Z, Stull JT, Levine RJ, Sweeney HL (1998). Changes in interfilament spacing mimic the effects of myosin regulatory light chain phosphorylation in rabbit psoas fibers. *J Struct.Biol.* **122**, 139-148.

Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C (2001). Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal.Chem.* **73**, 2836-2842.

Yates JR, III (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom.* **33**, 1-19.

Yi EC, Li XJ, Cooke K, Lee H, Raught B, Page A, Aneliunas V, Hieter P, Goodlett DR, Aebersold R (2005). Increased quantitative proteome coverage with (13)C/(12)C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme. *Proteomics*. **5**, 380-387.

Yin X, Cuello F, Mayr U, Hao Z, Hornshaw M, Ehler E, Avkiran M, Mayr M (2010). Proteomics analysis of the cardiac myofilament subproteome reveals dynamic alterations in phosphatase subunit distribution. *Mol.Cell Proteomics*. **9**, 497-509.

Yki-Jarvinen H, Virkamaki A, Daniels MC, McClain D, Gottschalk WK (1998). Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism*. **47**, 449-455.

Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ (2008). A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat.Chem.Biol.* **4**, 483-490.

- Zachara NE (2009). Detection and analysis of (O-linked beta-N-acetylglucosamine)-modified proteins. *Methods Mol Biol.* **464**, 227-254.
- Zachara NE, Cheung WD, Hart GW (2004a). Nucleocytoplasmic glycosylation, O-GlcNAc: identification and site mapping. *Methods Mol.Biol.* **284**, 175-194.
- Zachara NE and Hart GW (2004). O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim.Biophys.Acta.* **1673**, 13-28.
- Zachara NE and Hart GW (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim.Biophys.Acta.* **1761**, 599-617.
- Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004b). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J.Biol.Chem.* **279**, 30133-30142.
- Zachara NE, Vosseller K, Hart GW (2011). Detection and analysis of proteins modified by O-linked N-acetylglucosamine. *Curr.Protoc.Protein Sci.* **Chapter 12**, Unit12-
- Zaima N, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Setou M (2010). Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Int.J Mol Sci.* **11**, 5040-5055.
- Zaro BW, Chuh KN, Pratt MR (2014). Chemical reporter for visualizing metabolic cross-talk between carbohydrate metabolism and protein modification. *ACS Chem Biol.* **9**, 1991-1996.
- Zaro BW, Yang YY, Hang HC, Pratt MR (2011). Chemical reporters for fluorescent detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **108**, 8146-8151.
- Zeidan Q and Hart GW (2010). The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J.Cell Sci.* **123**, 13-22.
- Zeidan Q, Wang Z, De MA, Hart GW (2010). O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Mol.Biol.Cell.* **21**, 1922-1936.
- Zeytuni N and Zarivach R (2012). Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure.* **20**, 397-405.
- Zhang D, Cai Y, Chen M, Gao L, Shen Y, Huang Z (2015). OGT-mediated O-GlcNAcylation promotes NF-kappaB activation and inflammation in acute pancreatitis. *Inflamm.Res.*
- Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE (2003). O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell.* **115**, 715-725.
- Zhang G, Ueberheide BM, Waldemarson S, Myung S, Molloy K, Eriksson J, Chait BT, Neubert TA, Fenyo D (2010). Protein quantitation using mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* **673**, 211-222.
- Zhang L, Ren F, Li J, Ma X, Wang P (2009). A Modified Coupled Enzyme Method for O-linked GlcNAc Transferase Activity Assay. *Biol.Proced.Online.* **11**, 170-183.
- Zhang X and Bennett V (1996). Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier. *J.Biol.Chem.* **271**, 31391-31398.
- Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, III (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev.* **113**, 2343-2394.
- Zhang Z, Bast RC, Jr., Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW (2004). Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **64**, 5882-5890.

Bibliographie

- Zhao P, Viner R, Teo CF, Boons GJ, Horn D, Wells L (2011). Combining high-energy C-trap dissociation and electron transfer dissociation for protein O-GlcNAc modification site assignment. *J Proteome.Res.* **10**, 4088-4104.
- Zhi G, Ryder JW, Huang J, Ding P, Chen Y, Zhao Y, Kamm KE, Stull JT (2005). Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**, 17519-17524.
- Zhou G, Sylvester JE, Wu D, Veach DR, Kron SJ (2011). A magnetic bead-based protein kinase assay with dual detection techniques. *Anal.Biochem.* **408**, 5-11.
- Zhu W, Leber B, Andrews DW (2001). Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* **20**, 5999-6007.
- Zhu Y, Shan X, Yuzwa SA, Vocadlo DJ (2014). The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J.Biol.Chem.* **289**, 34472-34481.

Annexes

Index des figures

Figure 1 : Structure du muscle squelettique.	16
Figure 2 : Représentation schématique du sarcomère, unité structurale fonctionnelle du muscle strié squelettique.	17
Figure 3 : Représentation de la molécule de myosine, protéine majeure des filaments épais.	19
Figure 4 : Modèle de l'arrangement moléculaire des troponines, de la tropomyosine et de l'actine au sein du filament fin.	20
Figure 5 : Théorie de la contraction musculaire par glissement des filaments et raccourcissement du sarcomère.	21
Figure 6 : Séquence des évènements conduisant à la génération d'une force et à la puissance.	23
Figure 7 : Représentation schématique du filament fin d'actine, associé aux protéines régulatrices de la contraction musculaire en présence ou en l'absence de calcium.	24
Figure 8 : Structures membranaires et moléculaires impliquées dans le couplage excitation-contraction.	25
Figure 9 : Protéines constitutives des myofilaments du sarcomère.	26
Figure 10 : Représentation schématique de la nébuline, illustrant son orientation, sa structure et ses protéines partenaires.	27
Figure 11 : Architecture des domaines de la titine dans le muscle strié, s'étendant sur la moitié d'un sarcomère, ainsi que ses différents ligands et les principales voies de signalisation impliquant la titine.	28
Figure 12 : Les filaments intermédiaires de desmine, véritables « organisateurs » cellulaires.	30
Figure 13 : Structure sarcomérique s'étendant entre deux stries Z successives.	30
Figure 14 : Interactomes des principales protéines présentes au niveau de la ligne M (A) et de la strie Z (B) dans le sarcomère du muscle strié squelettique.	31
Figure 15 : Les différents types de fibres musculaires.	33
Figure 16 : Représentation du cycle de O-GlcNAcylation.	36
Figure 17 : Voie de biosynthèse des hexosamines, permettant la synthèse de l'UDP-GlcNAc à partir du glucose.	38
Figure 18 : Structure de l'OGT.	40
Figure 19 : Structure de l'OGA.	42
Figure 20 : Voie des HBP et processus de O-GlcNAcylation/ dé-O-GlcNAcylation.	43
Figure 21 : Représentation schématique de la relation entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation pour une protéine donnée.	44
Figure 22 : Principales fonctions cellulaires régulées par la O-GlcNAcylation.	46
Figure 23 : La O-GlcNAcylation et son impact sur l'homéostasie physiologique et le développement de pathologies.	49
Figure 24 : De multiples propriétés (dimensions) des protéines, à l'origine de l'analyse protéomique multidimensionnelle.	53

Figure 25 : Représentation schématique de la différence entre les stratégies protéomiques « Top-down » et « Bottom-up ».....	54
Figure 26 : Classification des différentes stratégies pour la protéomique quantitative.....	56
Figure 27 : « Workflow » classique pour l'analyse protéomique « in-gel ».....	57
Figure 28 : Les différentes stratégies de protéomique quantitative par spectrométrie de masse.....	60
Figure 29 : Représentation schématique des différents composants pour le marquage isobarique multiplex et la quantification par spectrométrie de masse.....	61
Figure 30 : Représentation schématique des deux approches de quantification par spectrométrie de masse sans marquage des protéines/peptides (« label-free »).....	62
Figure 31 : Quantification absolue par spectrométrie de masse.....	65
Figure 32 : Principe de l'analyse protéomique par SELDI-TOF MS.....	66
Figure 33 : Principe de l'analyse protéomique par MALDI-MSI (MALDI Mass Spectrometry Imaging).....	67
Figure 34 : Cartographie 2D-PAGE du O-GlcNAcome du muscle strié squelettique.....	68
Figure 35 : Remodelage ventriculaire gauche post-infarctus.....	71
Figure 36 : Caractérisation de marqueurs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque.....	72
Figure 37 : Variation d'expression de l' α B-cristalline et de l'isocitrate déshydrogénase selon la sévérité de l'insuffisance cardiaque.....	73
Figure 38 : Représentation schématique de la technique du « marquage par le substrat ».....	76
Figure 39 : Marquage métabolique des protéines par la GlcNAz.....	77
Figure 40 : Stratégies d'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées.....	78
Figure 41 : Détection par fluorescence des protéines O-GlcNAcylées par la Click Chemistry, après transfert spécifique de GalNAz sur les protéines O-GlcNAcylées par la GalT ^{Y289L}	79
Figure 42 : Comparaison du marquage métabolique par la GlcNAz et du marquage enzymatique par la galactosyltransférase.....	82
Figure 43 : Cartographies du O-GlcNAcome, du phosphoprotéome et du protéome global.....	83
Figure 44 : Marquage des protéines O-GlcNAcylées par la GalNAz et l'alkyne-biotine.....	86
Figure 45 : Stratégie expérimentale choisie pour l'identification des sites de O-GlcNAcylation à partir d'extrait de cellules musculaires de type C2C12 différenciées en myotubes.....	87
Figure 46 : Identification des protéines O-GlcNAcylées : données préliminaires.....	89
Figure 47 : Stratégie de fractionnement du protéome de myotubes C2C12.....	89
Figure 48 : Profils protéiques de chaque fraction issue des différents protocoles de fractionnement.....	90
Figure 49 : Détermination des caractéristiques d'activation calcique avec la relation Tension/pCa.....	96
Figure 50 : Propriétés d'activation calcique de fibres musculaires lentes isolées du soléaire en présence de GlcNAc libre, de glycérol ou de GalNAc.....	98
Figure 51 : Profils protéiques des fibres musculaires incubées dans des solutions de GalNAc, de GlcNAc ou de glycérol.....	98
Figure 52 : Effet de l'augmentation du taux global de O-GlcNAcylation sur les propriétés d'activation calcique de fibres de soléaire.....	99

Figure 53 : Quantification de la variation de O-GlcNAcylation des protéines contractiles après traitement de biopsies de soléaire par la PUGNAc.....	100
Figure 54 : Expression de protéines régulatrices de la contraction dans des fibres lentes ou rapides.....	101
Figure 55 : Structure de la tête S1 de myosine.....	102
Figure 56 : Phosphorylation de la MLC2 dans le muscle strié.....	103
Figure 57 : Effet de la phosphorylation de la MLC2 sur le positionnement des têtes de myosine.....	105
Figure 58 : Méthodologie appliquée pour la localisation des sites de O-GlcNAcylation au niveau de la MLC2s.....	106
Figure 59 : Localisation des sites de O-GlcNAcylation sur la MLC2s.....	106
Figure 60 : Séparation des formes phosphorylées et non phosphorylée de la MLC2 par SDS-PAGE.....	108
Figure 61 : Caractérisation de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation de la MLC2s par chromatographies d'affinité.....	109
Figure 62 : Localisation des enzymes impliquées dans la phosphorylation et la O-GlcNAcylation de la MLC2s au niveau de l'appareil contractile.....	110
Figure 63 : Caractérisation d'un complexe multienzymatique par co-immunoprécipitation des enzymes d'intérêt, et détection de leurs partenaires protéiques par western blot.....	111
Figure 64 : Modification du degré de corrélation entre la MLCK et l'OGA suite à un épisode d'hypodynamie-hypokinésie.....	112
Figure 65 : Détermination de la variation du taux global de O-GlcNAcylation dans le soléaire et l'EDL consécutivement à l'HH.....	117
Figure 66 : Détermination de la variation du taux global de phosphorylation dans le soléaire et l'EDL consécutivement à l'HH.....	118
Figure 67 : Mesure de l'expression et de l'activité enzymatique de l'OGT et de l'OGA dans le soléaire et l'EDL après hypodynamie-hypokinésie.....	119
Figure 68 : Variation d'expression de la protéine de choc thermique HSP70.....	121
Figure 69 : Eléments moléculaires clés impliqués dans la plasticité musculaire (atrophie ou hypertrophie du muscle squelettique).....	122
Figure 70 : Voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, dépendante de l'IGF-1, impliquée dans la régulation de la masse musculaire.....	123
Figure 71 : Culture de cellules musculaires de type C2C12.....	126
Figure 72 : Identification des protéines de la voie de signalisation dépendante de l'IGF-1 modifiées par la O-GlcNAcylation.....	127
Figure 73 : O-GlcNAcylation de TSC2 selon sa localisation subcellulaire.....	127
Figure 74 : Etat d'activation de la protéine Akt (⁴⁷³ P-Akt) lors de la stimulation de myotubes C2C12 par l'IGF-1, ainsi que de P-TSC2 et de P-4EBP1 ; le diamètre des myotubes a également été mesuré.....	128
Figure 75 : Marquage des protéines néosynthétisées par la Click chemistry.....	130
Figure 76 : Principe général de l'approche « label-free » de mesure d'activité kinase ou phosphatase par spectrométrie de masse par l'intermédiaire de son peptidique.....	132
Figure 77 : Détermination de l'efficacité d'ionisation d'un peptide phosphorylé et d'un peptide glycosylé par rapport à un peptide non modifié.....	133

Figure 78 : Mesure de l'activité enzymatique d'Akt par spectrométrie de masse.....	134
Figure 79 : Mesure de l'activité enzymatique d'Akt par spectrométrie de masse à partir d'un extrait protéique.....	135
Figure 80 : Mesure de l'activité enzymatique de l'OGT par spectrométrie de masse.....	136
Figure 81 : Modulation du complexe TSC1-TSC2 par différents signaux intra- et extra-cellulaires (acides aminées, glucose, insuline...) et son rôle sur le complexe mTOR.....	138
Figure 82 : Localisation des sites de O-GlcNAcylation au niveau de la myosine.....	142
Figure 83 : Cartographie des protéines O-GlcNAcylées des filaments cytosquelettiques associant les myofibrilles au sarcolemme.....	143
Figure 84 : Mesure du taux d'UDP-GlcNAc et de l'activité OGA suite aux traitements des myotubes avec le DON et avec le thiamet G.....	146
Figure 85 : Quantification du taux global relatif de O-GlcNAcylation.....	147
Figure 86 : Changements de la morphométrie sarcomérique selon la variation du taux global de O-GlcNAcylation de la fraction myofilamentaire.....	148
Figure 87 : Analyse des complexes multiprotéiques par électrophorèse en conditions non dénaturantes, ou native-PAGE.....	150
Figure 88 : Profils protéiques d'extraits natifs de myotubes C2C12 non traités, ou traités par du DON ou du thiamet G, séparés par Red-native PAGE.....	151
Figure 89 : Représentation du réseau de filament intermédiaire de desmine.....	153
Figure 90 : Séparation de protéines myofilamentaires extraites de cellules C2C12 par électrophorèse bi-dimensionnelle.....	159
Figure 91 : Précipitation différentielle de protéines myofilamentaires.....	160
Figure 92 : Méthodologie pour la mesure de la variation de O-GlcNAcylation per site.....	162
Figure 93 : Interactome de la desmine.....	165
Figure 94 : Modulation des interactions entre la desmine et ses protéines partenaires.....	166
Figure 95 : Analyse protéomique différentielle de l'interactome de la desmine par une approche SILAC.....	168
Figure 96 : Séparation électrophorétique de la desmine selon le nombre de groupements phosphate.....	170
Figure 97 : Sites potentiels de O-GlcNAcylation au niveau de la desmine.....	171
Figure 98 : Représentation schématique des effets de mutation(s) de desmine dans les muscles de patients souffrant de desminopathies.....	173
Figure 99 : Perturbations morphologiques induites par le mutant E413K de la desmine.....	176
Figure 100 : Représentation schématique de la stratégie d'analyse protéomique pour l'identification et la quantification des composants protéiques des agrégats résultant de mutation de la desmine.....	178
Figure 101 : Représentation schématique du processus de dégradation de la myotiline dans les cellules musculaires.....	179

Index des tableaux

<u>Tableau I</u> : Points communs et différences entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation.....	37
<u>Tableau II</u> : Stratégies de quantification par spectrométrie de masse et par marquage isotopique.....	59
<u>Tableau III</u> : Comparaison des différentes méthodes de quantification (relative) par spectrométrie de masse.....	63
<u>Tableau IV</u> : Protéines musculaires portant le motif O-GlcNAc identifiées au cours de nos différentes études.....	69
<u>Tableau V</u> : Identification des protéines O-GlcNAcylées et des sites de O-GlcNAcylation.....	91
<u>Tableau VI</u> : Identification de protéines O-GlcNAcylées et localisation des sites modifiés sur certaines d'entre elles.....	92
<u>Tableau VII</u> : Protéines motrices et régulatrices de la contraction du muscle squelettique modifiées par la O-GlcNAcylation.....	95
<u>Tableau VIII</u> : Protéines structurales des filaments intermédiaires modifiées par la O-GlcNAcylation, indiquées figure 83.....	144
<u>Tableau IX</u> : Avantages et inconvénients des différentes méthodes biochimiques pour la caractérisation des interactions protéine-protéine.....	149
<u>Tableau X</u> : Protéines sarcomériques structurales faisant partie de complexes protéiques modulés suite à la variation du taux global de O-GlcNAcylation, et identifiées par spectrométrie de masse.....	152

Résumé

Le muscle squelettique est une machinerie particulièrement stable et efficace, responsable de la genèse d'une force lors de la contraction. Le sarcomère, unité fonctionnelle, résulte d'un assemblage macromoléculaire extrêmement organisé et sophistiqué, nécessitant une localisation précise et régulée de ses protéines constitutives. Une multitude de protéines structurales participent à cette organisation sarcomérique complexe, constituant un réseau très structuré, interconnecté, semi-cristallin, que l'on peut qualifier aujourd'hui de cytosquelette sarcomérique. Cette entité structurale présente une dynamique élevée, liée à la modulation des interactions protéine-protéine, mais aussi à l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de ces composants protéiques. En cas d'un déséquilibre de l'homéostasie, le muscle squelettique peut présenter une dramatique perte de masse : c'est l'atrophie fonctionnelle.

L'ensemble de mes travaux a été dédié à la caractérisation du rôle d'une glycosylation atypique, la O-GlcNAcylation, dans la physiologie et la physiopathologie musculaires. J'ai ainsi démontré que la O-GlcNAcylation est essentielle à la physiologie musculaire, puisqu'elle participe à la régulation de processus fondamentaux pour le muscle : (i) sa contractilité, par la modulation des propriétés d'activation calcique ; (ii) sa plasticité, par la modulation de l'homéostasie protéique ; (iii) son organisation structurale, par la modulation d'interactions protéine-protéine qui régissent l'organisation et la réorganisation du sarcomère.

J'envisage de poursuivre mon activité de recherche en caractérisant plus précisément le rôle exercé par la O-GlcNAcylation sur la fonction d'une protéine clé de la cytoarchitecture sarcomérique : la desmine. Je déterminerai l'impact d'une variation de O-GlcNAcylation sur d'autres modifications post-traductionnelles de la desmine (notamment la phosphorylation), sur son agrégation (exacerbée lors des desminopathies), et sur son interaction avec son chaperon moléculaire : l' α B-cristalline. J'envisage également de mieux comprendre l'impact de la O-GlcNAcylation sur la régulation de l'homéostasie protéique, avec un intérêt tout particulier pour les voies de signalisation qui régissent l'équilibre synthèse/dégradation protéiques, ainsi que sur les processus de dégradation protéique, en grande partie responsable de la perte de fonction du muscle lors de l'atrophie.

Abstract

Skeletal muscle is an intricate machinery extremely stable and efficient, responsible of the generation of force during contraction. The sarcomere, the functional unit, results from a macromolecular assembly highly organized and sophisticated, which need a precise and regulated location of constitutive proteins. A plethora of structural proteins are involved in this complex sarcomeric organization, constituted a highly structured network, interconnected, semi-cristalline, nowadays qualified as sarcomeric cytoskeleton. This structural entity is highly dynamic, linked to the modulation of protein-protein interactions, and also to the equilibrium between synthesis and degradation of proteins content. When homeostasis is imbalanced, skeletal muscle presents a dramatic loss of mass, corresponding to muscle atrophy.

All my works were dedicated to the characterization of the role of an atypical glycosylation, O-GlcNAcylation, in muscle physiology and physiopathology. I demonstrated that O-GlcNAcylation is essential for muscle physiology since it is involved in the regulation of fundamental muscle processes: (i) its contractility, through the modulation of calcium activation properties; (ii) its plasticity, through the modulation of protein homeostasis; (iii) its structural organization, through the modulation of protein-protein interactions responsible of the organization and reorganization of sarcomere.

I plan to continue my research activity to go further in the understanding of the role of O-GlcNAcylation on the modulation of the function of a key structural protein of the sarcomeric organization: desmin. I will determine the impact of the variation of O-GlcNAcylation on others post-translational modifications (in particular phosphorylation), on its aggregation (which is exacerbated in desminopathies), and on its interaction with its molecular chaperone: the α B-crystallin. I also plan to characterize the impact of O-GlcNAcylation in the regulation of protein homeostasis, with a focus on signaling pathways involved in protein synthesis/degradation equilibrium, as well as on protein degradation processes, largely responsible of the muscle mass loss during atrophy.