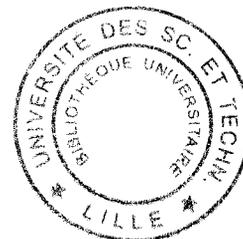


UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE BIOLOGIE

THÈSE
de Doctorat d'Université

Présentée par

Caroline CIENIEWSKI-BERNARD



pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
Discipline : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Etude de la *O*-N-acétylglucosaminylation
dans le muscle squelettique et son implication
dans la physiologie musculaire

Soutenue publiquement le 14 décembre 2005 devant la commission d'examen

Mme Yvonne MOUNIER Professeur des Universités, Lille I	Président
Mr Raymond JULIEN Professeur des Universités, Limoges	Rapporteur
Mme Gillian BUTLER-BROWNE Directeur de Recherches INSERM, Paris VI	Rapporteur
Mr Jean-Claude MICHALSKI Directeur de Recherches INSERM, Lille I	Directeur
Mr Bruno BASTIDE Maître de Conférences, Lille I	Directeur
Mr Luc BUEE Directeur de Recherches CNRS, Lille II	Examineur

A mon fils Clément

A Denis, à mes parents,

pour tout leur amour et leur soutien

A ma grand-mère,

A ma famille...

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé sous la direction du Docteur Jean-Claude MICHALSKI au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576), et sous la direction du Docteur Bruno BASTIDE au sein du Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire (UPRES-EA 1032).

Ce travail a bénéficié d'une allocation du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, puis d'un financement de fin de thèse scientifique de la Fondation pour la Recherche Médicale.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Jean-Claude Michalski, pour m'avoir accueillie au sein de son unité et de son équipe. Jean-Claude, je te remercie de m'avoir fait entièrement confiance et de m'avoir laissé autant d'autonomie tout au long de ces années de DEA puis de thèse, mais aussi et surtout pour m'avoir confié ce sujet qui m'a passionné toutes ces années...

Je remercie tout particulièrement le Dr. Bruno Bastide. Un grand merci pour votre disponibilité et votre patience, ainsi que pour tout le soutien que vous m'avez témoigné au cours de ces nombreuses années, même quand les résultats se faisaient attendre. Un grand merci pour vos nombreux conseils et les nombreuses « discussions du vendredi » qui se sont déroulées ces cinq années et pour tout ce que j'ai appris grâce à vous, en particulier d'avoir allumer puis entretenu la passion de la recherche dans les moments difficiles... Vous avez pris une part très active dans la réussite de ma thèse. J'espère de tout cœur avoir été à la hauteur de vos attentes...

Je tiens également à remercier le Pr. Yvonne Mounier pour avoir accueillie avec sourire et bonne humeur une biochimiste dans un laboratoire de physiologie. Je tiens également à vous remercier pour m'avoir confié ce sujet et d'avoir accepté de présider aujourd'hui mon jury de thèse.

Mes remerciements vont à Madame le Docteur Gillian Butler-Browne et à Monsieur le Professeur Raymond Julien pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury afin de juger mon travail de thèse. J'associe à ces remerciements le Docteur Luc Buée pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier les personnes m'ayant apporté leur aide technique, en particulier Adeline Page pour la MS-MS, Guy Dubreucq pour le dosage de phosphates, Yves Leroy pour la GC et la GC-MS, Willy Morelle pour la technique BEMAD, Marie-Christine Slomianny pour l'HPLC, et bien sur Tony Lefebvre pour m'avoir enseigné les techniques de biochimie et les rudiments de la recherche lors de mon arrivée au laboratoire. Merci encore à Tony, mais aussi à Anne-Sophie et Patricia pour la relecture de ce mémoire.

Je tiens également à remercier chaleureusement Julie pour son coup de main, surtout pour les Zip-tip et les colonnes ! Julie, je te souhaite bonne chance et surtout bon courage

pour les trois années à venir...

A mes « compères » de laboratoire : Catherine, David, Christophe, Séverine... Merci pour votre amitié et pour tous les bons moments passés ensemble ! Je vous souhaite à tous bonne chance pour l'avenir, tant au niveau personnel que professionnel. J'espère que nos chemins continueront de se croiser encore longtemps...

Je remercie tous les membres de mon équipe : Anne-Sophie, Calliope, Olivia, Tony, Willy, Céline, Marie-Christine, Frédéric, Valegh, Vanessa, Kevin et les autres... Une pensée aussi à Nadège, Aurélie, Sylvain, Céline V, Marlène, Gaëlle... et les autres membres du C9 que j'ai pu côtoyer toutes ces années passées au laboratoire.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Plasticité Neuromusculaire : Yvonne Mounier, Bruno, Maurice Falempin, Laurence Stevens, Julie et les autres pour leur accueil et leur disponibilité.

Une pensée chaleureuse aux enseignants avec qui j'ai réalisé l'enseignement de monitorat : Christophe, Elisabeth, Florence, Matthieu, Daniel, Willy, Tony, Frédéric...

Je remercie également la Fondation pour la Recherche Médicale pour son soutien financier de ma dernière année de thèse.

Evidemment, je remercie chaleureusement et sans compter mes parents sans qui mes (nombreuses) années universitaires auraient été beaucoup plus ardues, et Denis, pour son soutien à toute épreuve... Sans vous, je n'en serai pas là aujourd'hui... Merci à Nicolas, Valérie et leurs filles pour tous les bons moments passés ensemble, et aussi et surtout à mon petit « rayon de soleil »...

*Travaux
personnels*

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- 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
- 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
- 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
- Bozzo C, Spolaore B, Toniolo L, Stevens L, Bastide B, Cieniewski-Bernard C, Fontana G, Mounier Y and Reggiani C. (2005) Myosin light chain phosphorylation in denervated slow and fast rat skeletal muscles. *Eur. J. Biochem.* (sous presse)
- 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.* (en révision mineure)
- Stevens L, Bastide B, Maurage CA, Cieniewski-Bernard C, Montel V, Cuisset M, Vallée L and Mounier Y. (2005) Evolution of contractile and regulatory protein isoform expressions in childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Disease.* (soumis)

COMMUNICATIONS ORALES

- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Mounier Y, and Michalski JC. (2002) O-linked N-acetylglucosamine in normal and atrophied skeletal muscle. *13th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie*, Münster/Raesfeld, Allemagne.
- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Mounier Y, and Michalski JC. (2003) La O-N-acétylglucosaminylation dans le muscle squelettique normal et atrophié. *3^{ème} Journée André Verbert, Colloque Annuel des Doctorants*, Villeneuve d'Ascq, France. Présentation assurée par Lefebvre T.

- **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.
- **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.
- **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.

COMMUNICATIONS ÉCRITES

- **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.
- **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, Netherlands.
- **Bastide B, Cieniewski-Bernard C, Stevens L, Bozzo C, Lemoine J, Michalski JC and Mounier Y.** (2003) Characterization of some post-traductional modifications in rat skeletal muscle. *Société Française de Myologie*, Caen, France.
- **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.
- **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 HUPO

Sommaire

Sommaire

<u>INTRODUCTION.</u>	1
-----------------------------------	---

<u>GÉNÉRALITÉS.</u>	3
----------------------------------	---

Première partie *La O-N-acétylglucosaminylation*

<u>I - La O-N-acétylglucosaminylation : une glycosylation « originale ».</u>	3
A - Les différents types de glycosylation.	3
B - La O-N-acétylglucosaminylation.	5
1 - Définition.....	5
2 - La O-GlcNAc, une modification post-traductionnelle ubiquitaire et conservée.....	6
3 - Les sites de la O-GlcNAc.....	9
4 - O-GlcNAc et phosphorylation : homologie ou antagonisme ?.....	10
<u>II - Les enzymes de la O-GlcNAc : O-GlcNAc transférase et O-GlcNAcase.</u>	12
A - La O-GlcNAc transférase (OGT).	12
1 - Une glycosyltransférase cytosolique ?.....	12
2 - Structure et caractéristiques de la O-GlcNAc transférase.	13
3 - Régulation de l'OGT.....	14
4 - L'UDP-GlcNAc, donneur du résidu N-acétyl- β -D-glucosamine.....	15
B - La N-acétyl-β-D-glucosaminidase (O-GlcNAcase).	16
<u>III - Rôles de la O-GlcNAc.</u>	17
A - Transport nucléaire.	17
1 - Généralités sur le transport nucléaire.....	17
2 - O-GlcNAc et transport nucléaire.....	18
B - Régulation des interactions protéine-protéine : le cas du cytosquelette.	19
C - O-GlcNAc, dégradation protéique et stress cellulaire.	20
1 - Rôle de la O-GlcNAc dans le(s) processus de dégradation cellulaire.....	20
2 - O-GlcNAc et chaperons moléculaires.....	22
3 - O-GlcNAc : un senseur du stress cellulaire ?.....	23
D - Régulation de l'expression des protéines.	23
1 - Contrôle de la transcription.....	23
<i>Remodelage de la chromatine.</i>	23

<i>ARN polymérase II</i>	24
<i>Facteurs de transcription</i>	24
2 - Contrôle de la traduction.....	25
<u>IV - Implication de la O-GlcNAc dans la régulation cellulaire</u>	25
A - Transduction cellulaire	25
<i>Exemple de la voie de signalisation de l'insuline</i>	26
B - Senseur nutritionnel	28
C - Dérégulation de la O-GlcNAc : une implication possible dans certaines pathologies	29
1 - Cancer.....	29
2 - Maladies neurodégénératives.....	30
3 - Diabète de type II.....	31

Deuxième partie

Le muscle squelettique

<u>I - Introduction</u>	35
<u>II - Anatomie macroscopique et microscopique du muscle squelettique</u>	35
A - Organisation macroscopique	35
B - Organisation microscopique	36
<u>III - Structure et composition moléculaire des myofilaments</u>	38
A - Filaments épais de myosine	38
1 - Structure de la myosine.....	38
2 - Chaînes lourdes de myosine (MHC : myosin heavy chain).....	38
3 - Chaînes légères de myosine (MLC : myosin light chain).....	40
<i>MLC1 ou MLC essentielle</i>	40
<i>MLC2 ou MLC régulatrice</i>	40
B - Les filaments fins	41
1 - Structure du filament fin.....	41
2 - L'actine.....	41
3 - La tropomyosine (Tm).....	43
4 - Les troponines (Tn).....	44
<i>Troponine C (TnC)</i>	44
<i>Troponine I (TnI)</i>	45
<i>Troponine T (TnT)</i>	46
C - Les autres protéines sarcomériques	48
<u>IV - Contraction d'une fibre musculaire squelettique</u>	48
A - Théorie de la contraction par glissement des filaments	48
B - Mécanisme de la contraction musculaire	49

1 - Le cycle ATPasique de la myosine.....	49
2 - Régulation calcique de la contraction musculaire.....	51
C - Le couplage excitation-contraction.....	52
<u>V - Le métabolisme énergétique du muscle squelettique.....</u>	54
A - Régénération rapide de l'ATP.....	55
1 - Créatine kinase.....	55
2 - Adénylate kinase (AK) ou myokinase.....	57
B - Le système glycolytique.....	58
1 - La glycolyse.....	59
2 - Fermentation lactique.....	60
C - Le système oxydatif.....	61
1 - Description du cycle de Krebs.....	61
2 - Entretien du cycle.....	63
3 - Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP.....	63
D - Origine du glucose : le glycogène.....	64
<u>VI - Polymorphisme des fibres musculaires squelettiques.....</u>	65
A - Fibres lentes et fibres rapides.....	65
B - Expression des protéines myofibrillaires selon le type de fibre.....	67
C - Corrélation entre les propriétés d'un muscle et le pourcentage d'un type donné de fibres.....	68
<u>VII - Transition entre les différents types de fibres musculaires : plasticité musculaire.....</u>	69
A - Le muscle, une structure plastique.....	69
B - Plasticité des fibres musculaires squelettiques dans le modèle d'hypodynamie -hypokinésie.....	70
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</u>	72
<u>I - Matériel biologique.....</u>	72
A - Animaux.....	72
B - Muscles étudiés.....	72
C - Modèle d'hypodynamie-hypokinésie.....	72
D - Extraction des protéines contractiles.....	73
<u>II - Techniques électrophorétiques.....</u>	73
A - Préparation des échantillons.....	73
B - Electrophorèse monodimensionnelle.....	74
C - Electrophorèse bidimensionnelle.....	74

D - Coloration au nitrate d'argent.	75
E - Coloration au bleu de Coomassie.	75
<u>III - Technique du Western blot.</u>	75
A - Transfert sur membrane de nitrocellulose.	75
B - Révélation à la WGA.....	76
C - Révélation par anticorps.....	76
<u>IV - Purification des protéines-O-GlcNAc du muscle squelettique..</u>	77
A - Colonne de WGA-immobilisée.	77
B - Immunoprécipitation avec le RL-2.	78
<u>V - Purification de lectines musculaires reconnaissant le motif O-GlcNAc.</u>	78
<u>VI - Identification des protéines par spectrométrie de masse.</u>	79
A - Réduction – Alkylation.	79
B - Digestion « en gel ».....	79
C - Extraction des peptides.	80
D - Microdessalage sur Zip-TipC18.	80
E - Spectrométrie de masse.	81
1 - Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	81
2 - Spectrométrie de masse en tandem.....	81
F - Recherche dans les banques de données.....	82
<u>VII - Méthode de vérification rapide de la modification par O-GlcNAc d'une protéine donnée</u>	82
<u>VIII - Détermination des sites de O-GlcNAc.</u>	83
<u>IX - Détermination du taux global de O-GlcNAc.</u>	84
A - Autogalactosylation de la galactosyltransférase.....	84
B - Dosage du taux de O-GlcNAc.	84
C - Vérification de la spécificité du marquage.	85
<u>X - Dosage des activités enzymatiques.</u>	85

A - <i>O</i> -GlcNAc transférase.....	85
B - <i>O</i> -GlcNAcase.....	86
C - Expression des taux d'ARNm de la <i>O</i> -GlcNAc transférase et de la <i>O</i> -GlcNAcase.....	86
<u>XI - Dosage du taux de phosphate.....</u>	87
<u>XII - Etude de l'influence de la <i>O</i>-GlcNAc sur les relations tension/pCa.....</u>	87
A - Protocole de « pelage » chimique des biopsies.....	87
B - Mesure de la tension isométrique.....	88
1 - Isolement des fibres.....	88
2 - Enregistrement des tensions isométriques.....	89
3 - Expression des résultats.....	90
C - Rôles de la <i>O</i> -GlcNAc dans l'activité contractile des fibres musculaires.....	91
1 - Mise en évidence d'un rôle éventuel de la <i>O</i> -GlcNAc dans un processus d'interaction protéine-protéine.....	91
2 - Mise en évidence d'un rôle des motifs <i>O</i> -GlcNAc libres sur l'activité contractile.....	92
<u>XIII - Analyses statistiques.....</u>	92
<u>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....</u>	94
 <i>Première partie</i> <i>Identification des protéines-<i>O</i>-GlcNAc</i> <i>du muscle squelettique</i> 	
<u>I - Problématique.....</u>	94
<u>II - La protéomique : définition.....</u>	94
<u>III - Identification des protéines-<i>O</i>-GlcNAc isolées du gastrocnemius.....</u>	96
A - Nature de la glycosylation des glycoprotéines purifiées sur colonne de WGA.....	96
B - Analyse protéomique des protéines- <i>O</i> -GlcNAc du muscle squelettique.....	98

1 - Séparation des protéines- <i>O</i> -GlcNAc par électrophorèse bi-dimensionnelle.....	98
2 - Identification des protéines- <i>O</i> -GlcNAc du gastrocnemius par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	100
<u>IV - Identification des protéines-<i>O</i>-GlcNAc isolées du soleus.</u>	104
<u>V - Discussion.</u>	108
A - Enzymes impliquées dans la synthèse et la régénération de l'ATP intracellulaire.	108
B - Métabolisme énergétique.	110
1 - Glycolyse.....	110
2 - Cycle de Krebs.....	111
C - Métabolisme du glycogène.	111
D - Protéines contractiles.	112
E - Conclusion : la <i>O</i>-GlcNAc au sein du muscle squelettique.	112
1 - Source d'énergie du muscle squelettique.....	112
2 - Marqueurs d'atrophie musculaire.....	113

Deuxième partie
*Variation du taux de *O*-GlcNAc au cours*
de l'hypodynamie-hypokinésie

<u>I - Problématique.</u>	114
<u>II - Variation du taux de <i>O</i>-GlcNAc.</u>	115
A - Principe.	115
B - Variations du taux global de <i>O</i>-GlcNAc.	115
1 - Atrophie du muscle lent.....	115
2 - Dosage du taux global de <i>O</i> -GlcNAc.....	116
a) <i>Vérification du marquage.</i>	116
b) <i>Variations du taux de <i>O</i>-GlcNAc.</i>	117
<u>III - Variation des activités enzymatiques de la <i>O</i>-GlcNAc.</u>	118
A - Activité de la <i>O</i>-GlcNAc transférase.	118
B - Activité <i>O</i>-GlcNAcase.	120
C - Expression <i>O</i>-GlcNAc transférase/<i>O</i>-GlcNAcase.	121

<u>IV - Variation du taux de phosphate.</u>	122
<u>V - Variations d'expression des protéines de choc thermique.</u>	124
<u>VI - Discussion.</u>	125
A - Variation du taux de <i>O</i> -GlcNAc.....	125
B - Atrophie musculaire, HSP et dégradation protéasomale : quel est le rôle de la <i>O</i> -GlcNAc dans le processus d'atrophie musculaire.....	126

Troisième partie

O-GlcNAc et protéines contractiles

<u>I - Problématique.</u>	129
<u>II - Purification des protéines contractiles modifiées par la <i>O</i>-GlcNAc ou présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif <i>O</i>-GlcNAc.</u>	129
A - Purification des protéines contractiles.	129
B - Purification des protéines contractiles- <i>O</i> -GlcNAc.....	130
C - Confirmation de la nature <i>O</i> -GlcNAc des protéines contractiles.....	132
D - Purification des protéines contractiles présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif <i>O</i> -GlcNAc.....	134
E - Identification des protéines contractiles présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif <i>O</i> -GlcNAc par approche protéomique.....	136
<u>III - Localisation de sites modifiés par la <i>O</i>-GlcNAc.</u>	137
A - Principe de la détermination des site de <i>O</i> -GlcNAc.	137
B - Détermination du site de <i>O</i> -GlcNAc sur la MLC2s.	138
<u>IV - Rôles de la <i>O</i>-GlcNAc dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires.</u>	143
A - Pourquoi étudier les caractéristiques d'activation calcique ?.....	143
B - Rôles de la <i>O</i> -GlcNAc dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires.....	145
1 - Caractérisation de la glycosylation des biopsies.....	145
2 - Détermination de la concentration de N-acétylglucosamine à utiliser pour lever les interactions protéine-protéine dépendante de la <i>O</i> -GlcNAc.....	146

3 - Effet de l'hyperosmolarité sur la sensibilité calcique.....	147
4 - Influence de la GlcNAc sur les valeurs P et P ₀	149
5 - Effet de la O-GlcNAc sur la sensibilité calcique.....	150
6 - Profil électrophorétique des fibres incubées en présence de glycérol, de GalNAc ou de GlcNAc.....	153
7 - Rôles des motifs O-GlcNAc libres sur la sensibilité calcique.....	154
<u>V - Discussion.</u>	156
<u>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.</u>	161
<u>I - O-GlcNAc et métabolisme musculaire.</u>	161
<u>II - O-GlcNAc et atrophie induite par hypodynamie-hypokinésie.</u>	163
<u>III - O-GlcNAc et contraction musculaire.</u>	164
<u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	167
<u>ANNEXES.</u>	199
<u>Figures et tableaux.</u>	

Abréviations

- EDL** : extensor digitorum longus
- GC** : « gas chromatography » (chromatographie en phase gazeuse)
- GFAT** : glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase
- HH** : hypodynamie-hypokinésie
- HPLC** : « high performance liquid chromatography » (chromatographie liquide haute performance)
- HRP-WGA** : « horse radish peroxidase » (WGA couplée à la peroxydase)
- HSP** : heat shock protein ; protéine de choc thermique
- IEF** : isoélectrofocalisation
- MALDI-TOF MS** : « matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry » (spectrométrie de masse par désorption/ionisation par tir laser assisté par matrice et par mesure du temps de vol)
- MHC** : « myosin heavy chain » (chaîne lourde de myosine)
- MLC** : « myosin light chain » (chaîne légère de myosine)
- MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem
- O-GlcNAc** : O-N-acétyl-glucosaminylation
- O-GlcNAcase** : N-acétyl- β -D-glucosaminidase
- OGT = O-GlcNAc transférase** : uridine diphospho-N-acétyl-glucosaminyl transférase
- PNGase F** : peptide N-glycosidase F
- PNP** : para-nitrophénol
- PNP-GlcNAc** : para-nitrophényl-N-acétylglucosamine
- PUGNAc** : O-(2-acétamido-2-déoxy-D-glucopyranosilidène)amino-N-phénylcarbamate
- RL-2** : anticorps anti-O-GlcNAc
- rpm** : rotation par minute
- RT-PCR** : « reverse transcription – polymerase chain reaction » (réaction en chaîne de la polymérase – transcription en phase réverse)
- SDS-PAGE** : « sodium dodécyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis » (électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate)
- TBST** : « tris buffer saline – Tween 20 »
- Tm** : tropomyosine
- Tn** : troponine
- TPR** : « tétratricopeptide repeat »
- UDP-GlcNAc** : uridine diphospho-N-acétylglucosamine
- WGA** : « wheat germ agglutinin » (lectine isolée du germe de blé)
- 2D** : électrophorèse bidimensionnelle

Mono- et disaccharides :

GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
GalNAc	N-acétyl-D-galactosamine
Xyl	Xylose
Gal	Galactose
Ara	Arabinose
Man	Mannose
Glc	Glucose
Fuc	Fucose
LacNAc	N-acétyl-D-lactosamine

Acides aminés :

Ala	A	Alanine
Arg	R	Arginine
Asn	N	Asparagine
Asp	D	Acide aspartique
Cys	C	Cystéine
Glu	E	Acide glutamique
Gln	Q	Glutamine
Gly	G	Glycine
His	H	Histidine
Ile	I	Isoleucine
Leu	L	Leucine
Lys	K	Lysine
Met	M	Méthionine
Phe	F	Phénylalanine
Pro	P	Proline
Ser	S	Sérine
Thr	T	Thréonine
Trp	W	Tryptophane
Tyr	Y	Tyrosine
Val	V	Valine

Introduction

La cellule est capable de répondre à son environnement par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles dynamiques. A de rares exceptions près, la glycosylation ne participe pas directement aux voies de signalisation cellulaire. La *O*-N-acétylglucosaminylation (dite *O*-GlcNAc) est une glycosylation originale dans le sens où elle ne fait intervenir qu'un unique monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine, lié sur des acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine) d'une protéine. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle dynamique rencontrée au niveau des protéines nucléaires et cytoplasmiques. Il existe pour la *O*-GlcNAc un couple de deux enzymes exerçant leur activité de manière antagoniste, et ce de manière analogue au système kinase/phosphatase ; en effet, l'uridine diphospho-N-acétylglucosaminyltransférase (ou *O*-GlcNAc transférase) permet le transfert du monosaccharide sur la protéine acceptrice, tandis que la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (ou *O*-GlcNAcase) hydrolyse ce résidu. La *O*-GlcNAc intervient dans de nombreux processus cellulaires, tels que la synthèse et la dégradation protéiques, le transport nucléaire, la signalisation cellulaire, etc..., et jouerait un rôle fondamental en tant que senseur nutritionnel, le taux de *O*-GlcNAc dépendant du taux de glucose entrant dans la cellule par l'intermédiaire de la voie de biosynthèse des hexosamines. La *O*-GlcNAc jouerait également un rôle dans la survie cellulaire lors de différents stress. Cette glycosylation est fondamentale pour la cellule, puisque l'absence de *O*-GlcNAc (par non-expression de la *O*-GlcNAc transférase) est létale pour les cellules embryonnaires.

Le processus de *O*-N-acétylglucosaminylation dans le muscle strié est encore peu étudié. Pourtant, le muscle squelettique est un modèle intéressant en ce qui concerne l'étude de la *O*-GlcNAc, puisque son métabolisme dépend fortement du glucose, mais également parce que de nombreux processus musculaires, tels que la contraction, dépendent de la phosphorylation. Or la *O*-GlcNAc est à la fois dépendante du taux de glucose mais également de la phosphorylation par l'intermédiaire d'une balance phosphorylation/*O*-N-acétylglucosaminylation. De plus, les fibres musculaires squelettiques sont des entités capables d'« ajuster » leur phénotype aux conditions extérieures, cette plasticité se traduisant par un certain nombre de modifications biochimiques et fonctionnelles. Le modèle de Morey (modèle d'hypodynamie-hypokinésie) permet d'induire une atrophie fonctionnelle au niveau des muscles lents antigravitaires ; ce modèle permet également d'induire un changement phénotypique au niveau du muscle lent, avec transition d'un phénotype lent en un phénotype rapide. L'étude des modifications de la *O*-GlcNAc au cours du processus particulier de l'atrophie musculaire est du plus grand intérêt, dans la mesure où cette glycosylation, antagoniste de la phosphorylation, est une modification post-traductionnelle dynamique très

Introduction

importante dans le contrôle des propriétés fonctionnelles des protéines, capable de répondre à certains stimuli cellulaires de manière analogue au système phosphorylation/déphosphorylation. De plus, le métabolisme énergétique est fortement modifié dans le muscle lent atrophié, avec notamment la transition d'un métabolisme initialement oxydatif en un métabolisme glycolytique.

Notre travail a porté sur l'étude de la *O*-N-acétylglucosaminylation dans le muscle squelettique, ainsi que de sa possible implication dans la physiologie musculaire et le développement de l'atrophie fonctionnelle du muscle lent postural. Dans la première partie de ce mémoire, nous nous proposons de définir ce qu'est la *O*-N-acétylglucosaminylation, afin de mettre en évidence son rôle fondamental dans la cellule. Nous nous intéresserons ensuite à la physiologie du muscle squelettique, plus particulièrement à ses propriétés contractiles et fonctionnelles, puis nous nous attarderons plus en détail sur certains de ses processus, en particulier la contraction et le métabolisme musculaires. Nos travaux se traduiront par trois chapitres démontrant l'importance exercée par la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique. Grâce à l'identification des protéines-*O*-GlcNAc musculaires (premier chapitre), nous mettons en évidence l'intervention de la *O*-GlcNAc dans tous les moyens de régénération d'énergie du muscle squelettique, ainsi que dans le processus contractile. Nous mettons également en évidence la possible implication de la *O*-GlcNAc dans l'atrophie induite par le modèle d'hypodynamie-hypokinésie (second chapitre), en particulier par la modification de six marqueurs précoces de l'atrophie musculaire ainsi que par des variations du taux global de *O*-GlcNAc associées au degré d'atrophie du muscle. L'analyse du rôle de la *O*-GlcNAc sur l'activité contractile (troisième chapitre), et en particulier sur la sensibilité calcique des fibres musculaires, a également été envisagée, et nos travaux démontrent que cette glycosylation semble jouer un rôle clé dans le processus contractile des fibres musculaires.

Généralités

Première partie

*La O-N-acétyl-
glucosaminylation*

I – La O-N-acétylglucosaminylation : une glycosylation « originale ».

A – Les différents types de glycosylation.

La synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme. Pendant la traduction, ou une fois entièrement synthétisées, les protéines subissent des modifications co- ou post-traductionnelles. Ces modifications, contribuant à augmenter la complexité du protéome, ont pour but de réguler l'activité des protéines, de les intégrer à une cascade de signalisation, de les adresser à un compartiment cellulaire, de les ancrer à la membrane, ou encore de les « étiqueter » afin qu'elles soient reconnues par d'autres molécules ou par les systèmes de dégradation cellulaire.

Parmi les nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation, la carboxylation, la myristoylation, l'ubiquitinylation, etc..., la phosphorylation et la glycosylation sont sans doute les plus couramment rencontrées. La glycosylation modifie les protéines par fixation covalente d'oligosaccharides au niveau de certains acides aminés (asparagine pour la N-glycosylation, sérine ou thréonine pour la O-glycosylation) ; cette modification post-traductionnelle joue des rôles majeurs au niveau de la cellule, en particulier :

- elle permet de stabiliser la structure tridimensionnelle des protéines sous leur forme biologiquement active et de protéger la chaîne polypeptidique des attaques protéolytiques, comme c'est le cas pour les mucines ;
- ils déterminent la demi-vie des glycoprotéines circulantes et des cellules, comme dans le cas du récepteur des asialoglycoprotéines ;
- ce sont des sites récepteurs d'hormones, de protéines, de microorganismes, etc..., par exemple le récepteur des hormones de croissance ;
- les glycannes de surface contrôlent la perméabilité de la membrane, et interviennent également dans la régulation du métabolisme et de la division cellulaires. Une modification de leur structure et/ou de leur distribution peuvent conduire à des perturbations plus ou moins importantes du métabolisme, comme c'est le cas dans certains cancers ;
- les glycannes sont impliqués dans la reconnaissance cellule-cellule et dans l'adhésion de par l'existence de lectines membranaires, par exemple les galectines ;

Généralités : la O-N-acétylglucosaminylation

- les glycannes des glycolipides et des glycoprotéines membranaires sont des épitopes des antigènes tissulaires, des bactéries, des champignons, de l'enveloppe des parasites, ainsi que ceux des antigènes associés aux tumeurs. On peut en particulier citer les antigènes des groupes sanguins ABH ;
- les glycannes peuvent moduler la reconnaissance des protéines virales par le système immunitaire, en masquant ou en altérant la nature des sites antigéniques des glycoprotéines de l'enveloppe virale, par exemple la glycoprotéine GP120 du virus d'immunodéficience humaine.

Il est aujourd'hui largement admis que les glycoprotéines sont localisées exclusivement à la surface cellulaire ou dans les compartiments lumenaux. En effet, les voies de biosynthèse et de sécrétion des glycoprotéines membranaires et sécrétées ont été élucidées, avec notamment la mise en évidence de glycosyltransférases, enzymes membranaires orientées vers la lumière du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Hirschberg & Snider, 1987).

Différents types de glycosylation sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : *Les principaux types de glycosylation.*

Type de glycoprotéines		Monosaccharide de la liaison	Acide aminé portant la glycosylation
<u>N-glycosylprotéines</u>		GlcNAc	Asn
<u>O-glycosylprotéines</u>	Mucine	GalNAc	Ser/Thr
	Protéoglycane	Xyl	Ser
	Collagène	Gal	OH-Lys
	Extensine	Ara	OH-Pro
	Levure	Man	Ser/Thr
	Glycogène	Glc	Tyr
	Nucléaire et cytoplasmique	GlcNAc	Ser/Thr
<u>C-glycosylprotéines</u>		Man	Trp
<u>O-fucosylprotéines</u>		Fuc	Ser/Thr

Cependant, la glycosylation ne concerne pas uniquement des protéines membranaires et sécrétées. En effet, il existe des glycoprotéines nucléaires et cytosoliques, en particulier :

- des résidus de N-acétylglucosamine attachés sur les acides aminés hydroxylés sérine et thréonine (Holt & Hart, 1986 ; Holt et coll., 1987a) ;
- des protéoglycannes contenant des résidus de *O*-Man, localisés exclusivement dans le cytoplasme de cerveau de rats adultes (Margolis et coll., 1976 ; Margolis et coll., 1979) ;
- des glycoprotéines de type héparane sulfate enrichis dans le noyau des cellules du foie de rat (Ishihara et coll., 1986 ; Fedarko & Conrad, 1986) ;
- des résidus de glucose attachés à des groupements hydroxyles de tyrosine d'une protéine cytosolique servant d'amorce à la synthèse du glycogène (Rodriguez & Whelan, 1985 ; Blumenfeld & Krisman, 1986) ;
- des résidus de mannose *O*-liés sur des protéines cytosoliques, substrat d'une glucose phosphotransférase cytoplasmique (Hiller et coll., 1987).

B – La O-N-acétylglucosaminylation.

1 – Définition.

La *O*-N-acétylglucosaminylation, dite *O*-GlcNAc, est une modification post-traductionnelle mise en évidence pour la première fois en 1984 (Torres & Hart, 1984). C'est une glycosylation particulière et originale dans le sens où elle ne fait intervenir qu'un unique monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine, lié au niveau d'un acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine) d'une protéine par l'intermédiaire d'une liaison β .

La *O*-GlcNAc est particulièrement abondante dans le cytosol et le noyau (Holt & Hart, 1986 ; Kearsse & Hart, 1991a), contrairement aux glycosylations classiques qui modifient des protéines localisées au sein du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, de la voie de sécrétion, ainsi que des protéines membranaires et sécrétées dans le milieu extracellulaire.

La *O*-N-acétylglucosaminylation des protéines nucléaires et cytosoliques est représentée schématiquement figure 1.

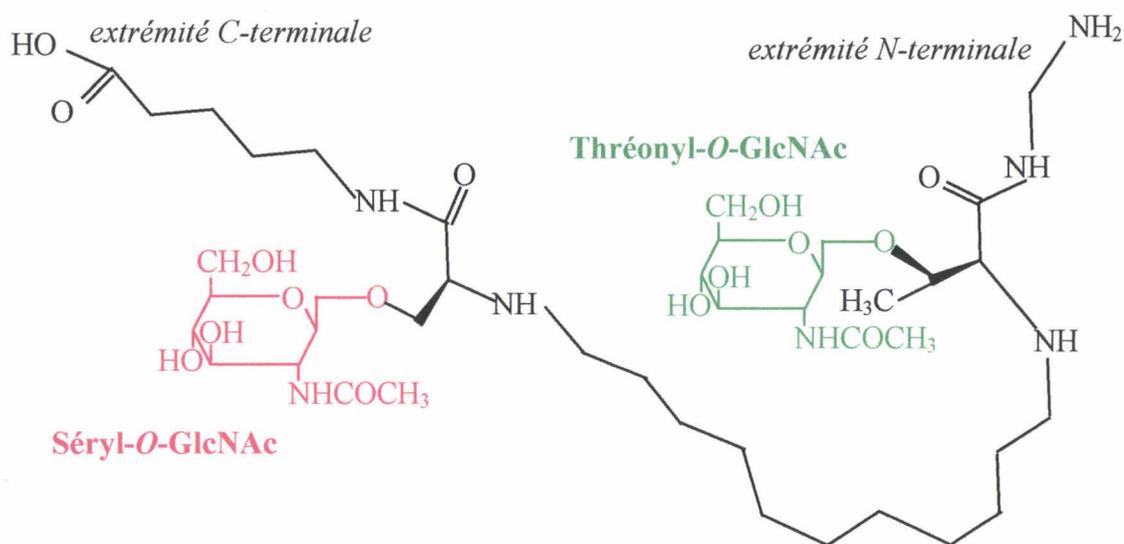


Figure 1 : Représentation schématique de la O-N-acétyl-β-D-glucosaminylation.

2 – La O-GlcNAc, une modification post-traductionnelle ubiquitaire et conservée.

Depuis sa découverte il y a vingt ans, de nombreuses protéines ont été identifiées comme étant O-GlcNAc. Les protéines ainsi modifiées sont de natures très variées, regroupant des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des suppresseurs de tumeur, des oncogènes, des protéines virales, des kinases, des phosphatases, des protéines de choc thermique, des enzymes cytosoliques, des protéines du pore nucléaire, le protéasome... La figure 2 met en évidence la grande variété des protéines modifiées par la O-GlcNAc, tandis que le tableau II dresse une liste non exhaustive des protéines-O-GlcNAc.

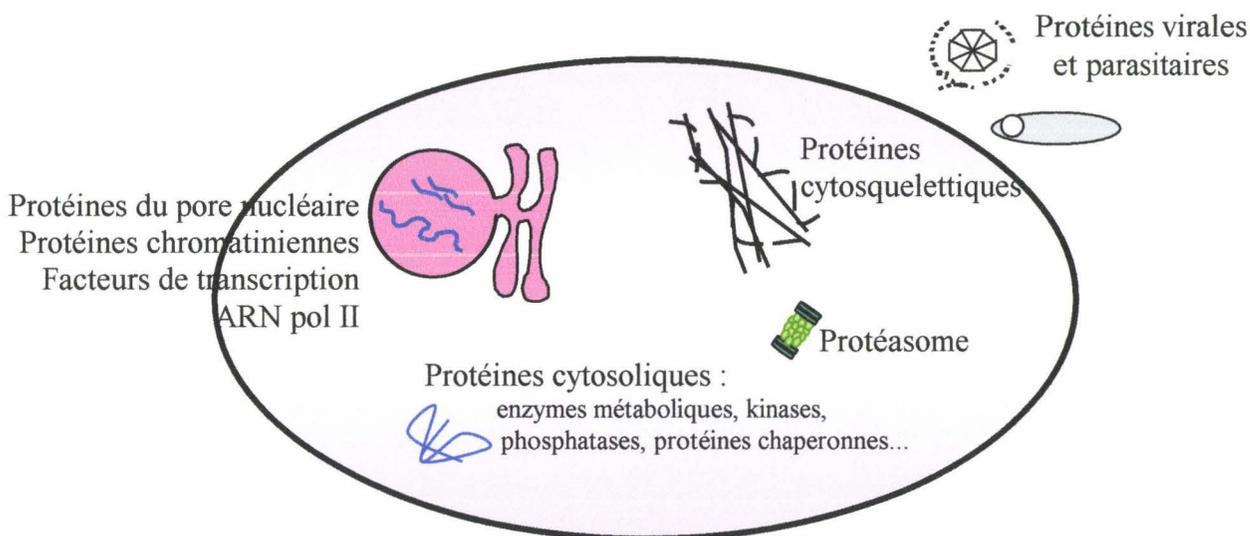


Figure 2 : Diversité des classes protéiques modifiées par la O-GlcNAc au sein de la cellule.

Tableau II : Tableau récapitulatif des protéines-O-GlcNAc identifiées à ce jour.

Famille de protéines	Protéines	Références
Protéines chaperonnes	HSP27	Roquemore et coll., 1992 Roquemore et coll., 1996
	HSC70	Lefebvre et coll., 2001
	HSP70	Walgren et coll., 2003 Guinez et coll., 2004
Protéines chromatinienne	protéines associées à la chromatine	Kelly & Hart, 1989
Protéines cytosquelettiques		
fixées à l'actine	E-cadhérine	Zhu et coll., 2001
	myosine bande 4.1	Cieniewski-Bernard et coll., 2004
	synapsine	Inaba & Maede, 1989
	taline	Cole & Hart, 1999
		Hagmann et coll., 1992
filaments intermédiaires	kératines 8, 13, 18	King & Hounsell, 1989 Chou et coll., 1992
	neurofilaments H, M, L	Dong et coll., 1993
associées aux microtubules	α -tubuline	Walgren et coll., 2003
	MAP2, MAP4	Dong et coll., 1996 Ding & Vandre, 1996
	Tau	Arnold et coll., 1996
autres	fibres de type 2 et 5 de l'adénovirus	Caillet-Boudin et coll., 1989 Mullis et coll., 1990
	AP-3, AP-180	Murphy et coll., 1994 Yao & Coleman, 1998
	précurseur du β -amyloïde	Griffith et coll., 1995
	β -synucléine	Cole & Hart, 2001
Kinases	caséine kinase II	Lubas & Hanover, 2000
	glycogène synthase kinase-3	Lubas & Hanover, 2000
	IRS-1, IRS-2	Patti et coll., 1999 Vosseler et coll., 2002b Federici et coll., 2002
	PI3 kinase	Federici et coll., 2002
Enzymes métaboliques	énolase	Wells et coll., 2002 Cieniewski-Bernard et coll., 2004
	créatine kinase	Cieniewski-Bernard et coll., 2004
	nitric oxyde synthase endothéliale	Du et coll., 2001
	GAPDH	Wells et coll., 2002 Cieniewski-Bernard et coll., 2004
	malate déshydrogénase	Cieniewski-Bernard et coll., 2004
	triose phosphate isomérase	Cieniewski-Bernard et coll., 2004

Généralités : la O-N-acétylglucosaminylation

	fructose biphosphatase aldolase	Cieniewski-Bernard et coll., 2004
	glycogène synthase	Parker et coll., 2003
	phosphoglycérate kinase	Wells et coll., 2002
	pyruvate kinase	Wells et coll., 2002
Récepteurs hormonaux	mER α , mER β	Jiang & Hart, 1997 Cheng & Hart, 2000
Protéines du pore nucléaire	Nup 62	Hanover et coll., 1987
	Nup 153, 214, 358	Favreau et coll., 1996
	Nup 180	Sukegawa & Blobel, 1993
	Nup 54, 155	Wells et coll., 2002
Phosphatases	tyrosine phosphatase nucléaire p65	Meikrantz et coll., 1991
	inhibiteur phosphatase 2a	Wells et coll., 2002
Polyméras	ARN polymérase II	Kelly et coll., 1993
Proto-oncogènes	c-Myc	Chou et coll., 1995a
	protéines RNA-binding du sarcome d'Ewing	Wells et coll., 2002 Matsuoka et coll., 2002
	β -caténine	Lefebvre et coll., 2004a
	CREB	Lamarre-Vincent & Hsieh-Wilson, 2003
	EF-2D	Wells et coll., 2002
	HNF-1	Lichsteiner & Schibler, 1989
	NF- κ B	James et coll., 2002
	OIP-106	Iyer & Hart, 2003a
	p53	Shaw et coll., 1996
	PDX-1, IPF-1, STF-1	Gao et coll., 2003
	PAX-6	Lefebvre et coll., 2002
	SRF	Reason et coll., 1992
	Sp1	Jackson & Tjian, 1988
	YY1	Hiromura et coll., 2003
Suppresseur de tumeur	p53 HIC-1	Fiordaliso et coll., 2001 Lefebvre et coll., 2004b
Protéines virales	Gp41 du baculovirus	Whitford & Faulkner, 1992
	HCMV UL32 (BPP)	Greis et coll., 1994
	NS26 du rotavirus	Gonzales & Burrone, 1991
	antigène T du SV-40	Medina et coll., 1998
	phosphoprotéine basique du virion	Benko et coll., 1988
Autres	EIF2 α p67	Datta et coll., 1989
	GRIF-1	Iyer et coll., 2003
	O-GlcNAc transférase	Kreppel et coll., 1997
	ubiquitin carboxy hydrolase	Cole & Hart, 2001
	anhydrase carbonique III	Cieniewski-Bernard et coll., 2004

Par ailleurs, la O-GlcNAc est décrite dans de nombreux organismes. Ainsi, elle est détectée chez les Procaryotes (Schirm et coll., 2004), les virus, tels que SV40 (Medina et coll.,

1998) ou le cytomégalo virus (Greis et coll., 1994), les schistosomes (Dieckmann-Schuppert et coll., 1993), la levure, la drosophile (Kelly & Hart, 1989), les grenouilles (Slawson et coll., 2002), les rongeurs, et bien sûr chez l'Homme. Elle a également été détectée les plantes (Swain et coll., 2001).

3 – Les sites de la O-GlcNAc.

Contrairement à la N-glycosylation dont la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X peut correspondre à n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline) permet l'attachement d'un N-glycane sur la protéine, la O-GlcNAc ne possède pas de séquence consensus proprement dite. Néanmoins, il existe certaines exigences nécessaires à l'attachement du monosaccharide sur la protéine, en particulier la présence d'un résidu de proline à proximité du site de O-GlcNAc, ainsi que de nombreux résidus adjacents de sérine et de thréonine.

Certains sites de O-GlcNAc ont été identifiés, par exemple la sérine 16 du récepteur murin des oestrogènes mER β (Cheng & Hart, 2001), ou encore la thréonine 58 de la protéine c-Myc (Chou et coll., 1995b). Des études de spécificité de substrat de la O-GlcNAc transférase (Haltiwanger et coll., 1990), qui transfère le monosaccharide sur la protéine, ont permis d'établir que les sites de O-GlcNAc sont similaires à ceux reconnus par un certain nombre de kinases, en particulier des kinases proline-dépendantes (Vulliet et coll., 1989), suggérant que O-GlcNAc et phosphorylation peuvent être réciproques. Le tableau III regroupe les séquences peptidiques portant le motif de O-GlcNAc de quelques protéines.

Tableau III : Exemples de séquences peptidiques de O-N-acétylglucosaminylation.

Type PVS/T ou PS/TV	
α B-cristalline du singe rhésus	..EEKPAV <u>T</u> AAPK..
protéine de l'érythrocyte humain de 65 kDa	..D <u>S</u> PVSQPSLVGSK..
neurofilament L	..PV <u>S</u> SS..
neurofilament M	..GSP <u>S</u> T <u>V</u> SSSYK...PSV <u>T</u> ISSK..

Type riche en S/T ou quelconque	
c-fos	..TQT <u>SSSG</u> TVT..
ARN polymérase II	..(S/T)P(S/T)SP... TPT <u>T</u> SPN... SPT <u>T</u> SPT..
bande 4.1 de l'érythrocyte	..AQTT <u>S</u> ETPSSTT..
protéine p62 du pore nucléaire	..MAGGPADT <u>S</u> DPL..

4 – O-GlcNAc et phosphorylation : homologie ou antagonisme ?

Comme la phosphorylation, la O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible (figure 3), et la demi-vie du motif O-GlcNAc est beaucoup plus courte que la demi-vie de la protéine qu'il modifie (Kearse & Hart, 1991b ; Chou et coll., 1992 ; Roquemore et coll., 1996).

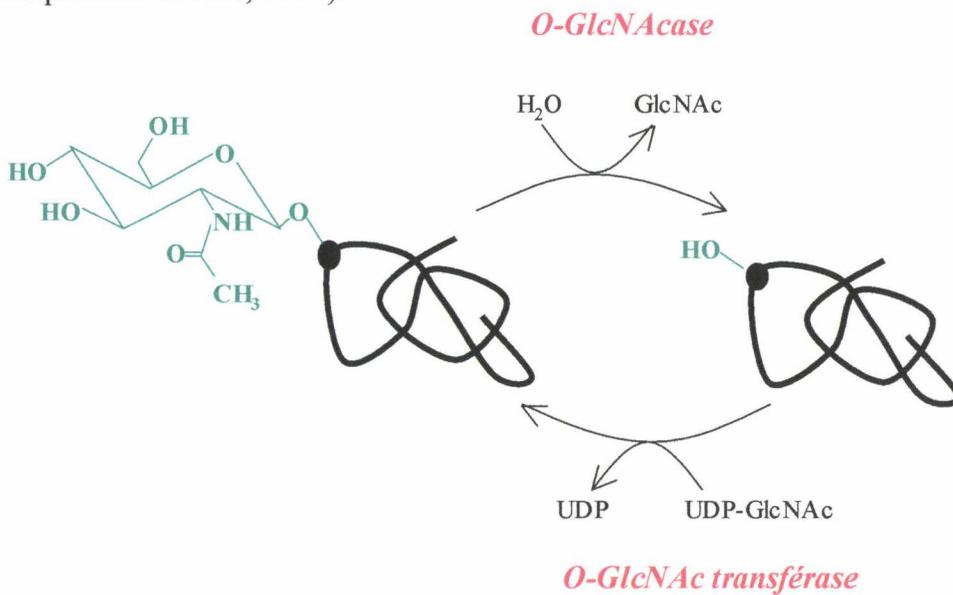


Figure 3 : La O-GlcNAc : une modification post-traductionnelle dynamique et réversible.

De par sa réversibilité, la O-GlcNAc est une modification analogue à la phosphorylation, puisque de la même manière que le système kinase/phosphatase, la O-GlcNAc est sous contrôle de deux enzymes agissant de manière antagoniste : la O-GlcNAc transférase, qui transfère le monosaccharide au niveau de la protéine, et la O-GlcNAcase, qui hydrolyse la liaison protéine-monosaccharide.

Par ailleurs, toutes les protéines-O-GlcNAc décrites à ce jour sont également des phosphoprotéines. Ainsi, une protéine pourra être soit glycosylée, soit phosphorylée, voire les

deux, et ce au niveau d'un même site, comme c'est le cas du récepteur murin β des oestrogènes (Cheng et coll., 2000), ou au niveau de sites différents, comme par exemple l'ARN polymérase II (Comer & Hart, 2001). Cette compétition de site entre la phosphorylation et la O-N-acétylglucosaminylation est communément appelée phénomène « Yin-Yang ».

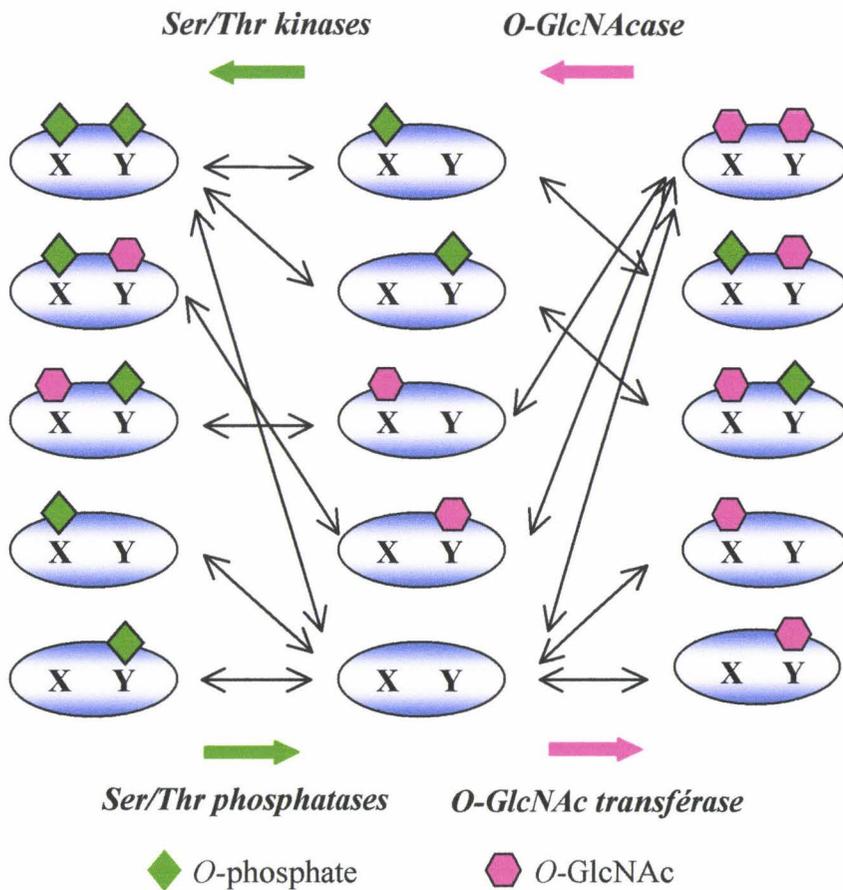


Figure 4 : *Compétition entre la phosphorylation et la O-N-acétylglucosaminylation pour une protéine présentant deux sites de modification. La phosphorylation et la O-GlcNAc peuvent modifier un même site ou des sites adjacents. (d'après Akimoto et coll., 2003).*

Le modèle décrit en figure 4 prédit certaines combinaisons possibles entre les groupements O-GlcNAc et O-phosphate dans le cas très simple où une protéine ne possède que deux sites de modification. Au vue du nombre de formes de la protéine, liées à l'hétérogénéité en terme de modifications post-traductionnelles, il faut admettre que le « Yin-Yang » phosphorylation/O-GlcNAc permet d'exercer un haut degré de régulation au niveau des protéines, chacune de ces formes protéiques pouvant avoir des propriétés physiques et biologiques différentes.

Enfin, si la *O*-GlcNAc est homologue à la phosphorylation de par l'existence du couple *O*-GlcNAc transférase/*O*-GlcNAcase (similaire au système kinase/phosphatase), elle peut jouer un rôle biologique antagoniste à la phosphorylation. Par exemple, on sait que la phosphorylation d'une séquence PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) (Rechsteiner & Rogers, 1996) est un signal de dégradation d'une protéine. Au contraire, la *O*-GlcNAc protégerait la protéine de la dégradation grâce à la fixation d'un résidu *O*-GlcNAc bloquant la phosphorylation ; cette hypothèse a été émise dans le cas du récepteur murin β des oestrogènes (Cheng & Hart, 2001). Un autre exemple d'antagonisme entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAc est l'ARN polymérase II. En effet, l'ARN polymérase II doit être phosphorylée au niveau de son domaine C-terminal pour entrer dans la phase d'élongation par l'assemblage du complexe de transcription. Or, il semble que la modification par *O*-GlcNAc du domaine C-terminal bloque la phosphorylation, et que le monosaccharide doit être hydrolysé en vue de la phosphorylation du domaine C-terminal afin que l'ARN polymérase II passe de la phase d'initiation à la phase d'élongation (Comer & Hart, 2001).

Une balance entre le taux de phosphorylation et le taux de *O*-GlcNAc existe également au niveau cellulaire ; en effet, des modifications pharmacologiques du taux de phosphorylation affectent les taux de *O*-GlcNAc de manière opposée (Griffith & Schmitz, 1999). Certains agents tels que l'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatases) ou le dibutyryl cAMP (activateur de kinases) augmentent le taux de phosphorylation tandis que le taux de *O*-GlcNAc diminue (Lefebvre et coll., 1999). Au contraire, des inhibiteurs de kinases (tels que la staurosporine ou la rapamycine) provoquent une augmentation du taux de *O*-GlcNAc.

II – Les enzymes de la *O*-GlcNAc : *O*-GlcNAc transférase et *O*-GlcNAcase.

A – La *O*-GlcNAc transférase (OGT).

1 – Une glycosyltransférase cytosolique ?

La *O*-GlcNAc est une glycosylation exclusivement nucléaire et cytosolique ; la localisation d'une transférase du motif *O*-GlcNAc posait un réel problème de topologie, puisque les enzymes de biosynthèse des glycanes complexes sont localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Davis et Blobel (Davis & Blobel, 1987) démontrent distinctement l'existence d'une glycosylation cytosolique ; en effet,

leurs résultats suggèrent que le monosaccharide O-GlcNAc est additionné sur la protéine p62 seulement cinq minutes après sa synthèse, alors que p62 est encore soluble et cytosolique. Ces données suggèrent donc l'existence d'une enzyme transférant le résidu de N-acétylglucosamine dans le même compartiment cellulaire que la machinerie de synthèse des protéines.

En 1990, Haltiwanger identifie dans le cytosol de foie de rat l'uridine diphospho-N-acétylglucosaminyltransférase (O-GlcNAc transférase ou OGT), responsable de l'addition enzymatique du résidu de N-acétyl-D-glucosamine sur des protéines nucléaires et cytosoliques (Haltiwanger et coll., 1990 ; Haltiwanger et coll., 1992). Il faut attendre 1997 pour que l'OGT soit clonée ; le gène *Ogt* représente une nouvelle glycosyltransférase n'ayant aucune similarité de structure ou de séquence avec les autres glycosyltransférases (Kreppel et coll., 1997). Le gène est fortement conservé au cours de l'Evolution (Lubas et coll., 1997), et ce haut degré de conservation traduit une forte pression de l'Evolution, suggérant que l'*Ogt* code pour une protéine ayant une fonction cellulaire essentielle. Le gène de la O-GlcNAc transférase, localisé sur le locus Xq13, est ainsi essentiel pour la viabilité des cellules souches embryonnaires (Shafi et coll., 2000).

2 – Structure et caractéristiques de la O-GlcNAc transférase.

La O-GlcNAc transférase est une glycosyltransférase originale dans le sens où les autres glycosyltransférases sont des monomères liés à la membrane du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi, le site actif étant dirigé vers la lumière de l'organite. L'OGT est cytosoluble, de masse moléculaire de l'ordre de 340 kDa. Elle est constituée de deux sous-unités α de masse moléculaire 110 kDa, notées p110, et d'une sous-unité β de masse moléculaire 78 kDa, notée p78. La sous-unité de 110 kDa est constituée de deux domaines distincts (Kreppel et coll., 1997) :

- un domaine C-terminal, portant l'activité catalytique ;
- un domaine N-terminal contenant les motifs TPR ou « tetra tricopeptide repeat ». Les TPR sont des motifs de 34 acides aminés, fortement conservés au cours de l'Evolution, et dont les localisations cellulaires sont variées. Les TPR sont impliqués dans de nombreux sites de reconnaissance et de fixation de substrats (Lamb et coll., 1995 ; Das et coll., 1998).

Les données cinétiques suggèrent que l'OGT fonctionne selon un mécanisme enzymatique bi-bi-aléatoire, c'est-à-dire qu'elle fixe ses substrats (UDP-GlcNAc et protéine

acceptrice) de manière aléatoire (Kreppel & Hart, 1999).

3 – Régulation de l'OGT.

La O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle retrouvée sur une multitude de sites appartenant à des groupes divers de protéines ; or, il n'existe qu'un seul gène codant pour la O-GlcNAc transférase. Il doit donc exister un mécanisme de régulation de l'enzyme, pouvant conférer une spécificité temporelle et de substrat, notamment en réponse aux signaux cellulaires. La figure 5 met en évidence les différentes régulations possibles de l'OGT.

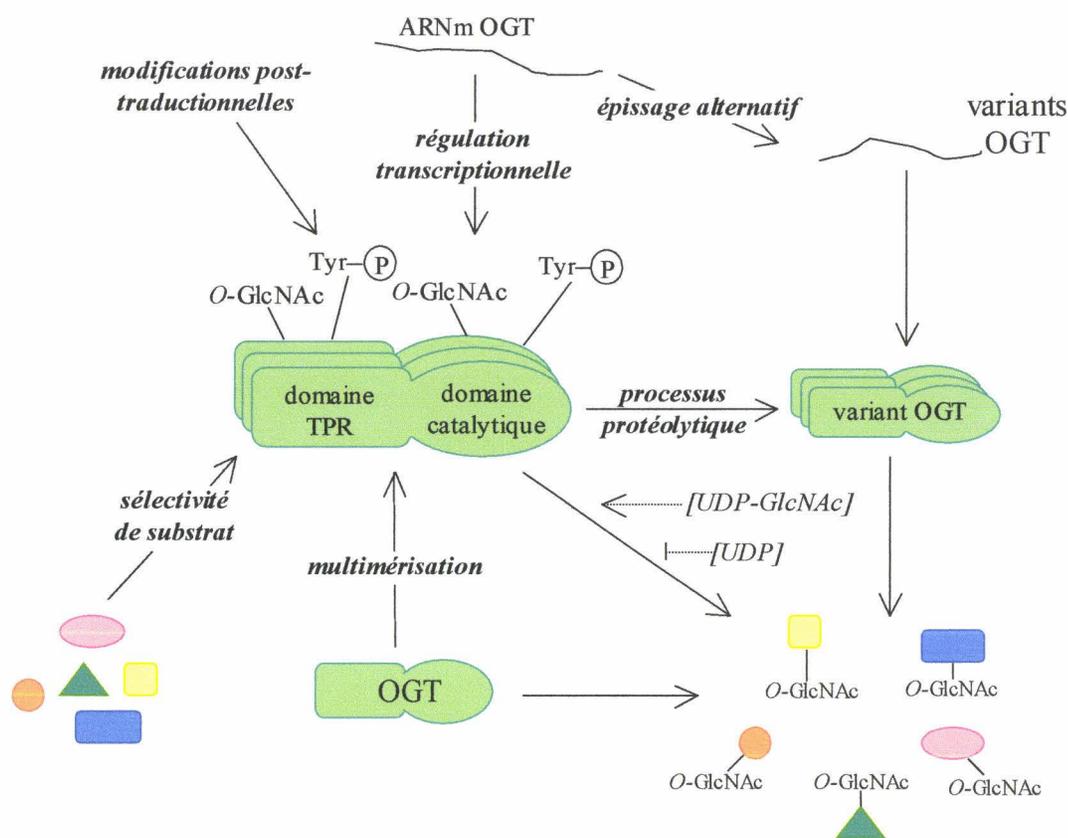


Figure 5 : Mécanismes de régulation possibles de l'OGT : régulation transcriptionnelle et post-traductionnelles, multimérisation et interactions de protéines accessoires ou de substrats avec la région des TPR (d'après Comer & Hart, 2000).

Les modifications post-traductionnelles sont un des moyens possibles de régulation de l'OGT. En effet, l'enzyme est elle-même modifiée par la O-GlcNAc, mais également par la phosphorylation d'un résidu de tyrosine (Kreppel et coll., 1997). Il pourrait également exister des protéines accessoires influant sur l'activité et/ou la spécificité de l'OGT. Il existe d'autres types de régulation de l'activité de l'OGT (Kreppel & Hart, 1999), avec un rôle important des

TPR, domaines d'interaction protéine-protéine, en particulier les interactions avec le substrat ou avec des protéines accessoires pouvant influencer sur la spécificité de l'enzyme. Les TPR influent également sur la multimérisation de l'enzyme, la sous-unité p110 pouvant former un homotrimère en l'absence de la sous-unité p78. La multimérisation de l'enzyme n'est pas nécessaire à l'activité enzymatique basale, mais influe sur l'affinité pour le sucre-donneur UDP-GlcNAc, et il existe ainsi trois K_m distincts pour l'UDP-GlcNAc, ce qui permet une régulation de l'activité enzymatique en réponse aux changements du pool intracellulaire d'UDP-GlcNAc.

4 – L'UDP-GlcNAc, donneur du résidu N-acétyl-β-D-glucosamine.

Le sucre donneur de la O-GlcNAc est l'UDP-GlcNAc. Dans la cellule, ce dernier est synthétisé à travers la voie de biosynthèse des hexosamines.

Une fois transporté dans la cellule, le glucose est rapidement converti en glucose-6-phosphate. Ce dernier est alors soit converti en glucose-1-phosphate, pour entrer dans la voie de synthèse du glycogène, soit converti en fructose-6-phosphate. Le fructose-6-phosphate va préférentiellement entrer dans la voie de la glycolyse, mais une petite proportion (de l'ordre de 2 à 5 %) va entrer dans la voie de biosynthèse des hexosamines (schématisée figure 6).

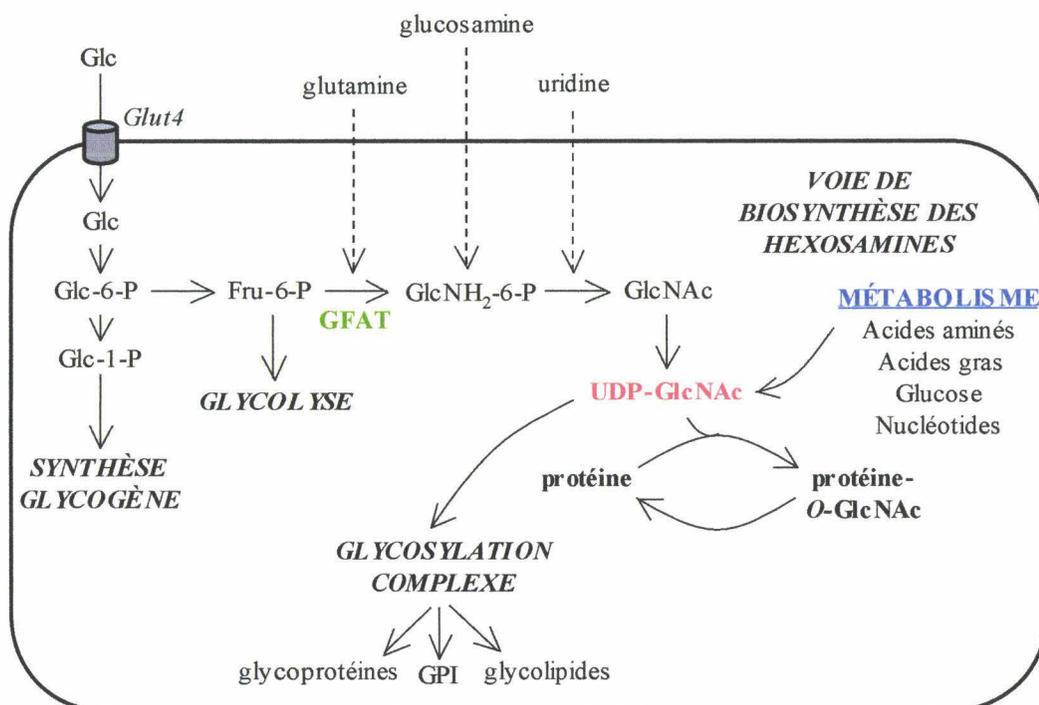


Figure 6 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hexosamines.

Le fructose-6-phosphate est alors converti en *N*-acétylglucosamine-6-phosphate, avec conversion concomitante de la glutamine en glutamate. L'enzyme responsable de cette réaction est la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase ou GFAT, enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines. La *N*-acétylglucosamine-6-phosphate est ensuite rapidement convertie en *N*-acétylglucosamine-1,6-diphosphate puis en uridine 5'-diphospho *N*-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc (Marshall et coll., 1991). Cet UDP-GlcNAc pourra alors servir de donneur pour la glycosylation de lipides et de glycoprotéines sécrétées ou membranaires, pour l'ancrage GPI et pour la *O*-*N*-acétylglucosaminylation.

La concentration de l'UDP-GlcNAc exerce un rétrocontrôle sur l'activité de la GFAT : lorsque la concentration de l'UDP-GlcNAc augmente, l'activité de la GFAT sera diminuée, et on observera également une augmentation de la *O*-GlcNAc sur les protéines nucléaires et cytosoliques.

B – La *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase (*O*-GlcNAcase).

La *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase ou *O*-GlcNAcase, spécifique de l'hydrolyse des résidus de *O*-GlcNAc, a été purifiée et caractérisée en 1994 (Dong & Hart, 1994) puis clonée en 2001 (Gao et coll., 2001). L'enzyme, dont le pH optimum est neutre, clive spécifiquement des résidus de *N*-acétyl-D-glucosamine dont le carbone C1 est engagé dans une liaison β . Elle est inhibée par des analogues de la GlcNAc, par exemple la streptozotocine (Konrad et coll., 2001) ou la PUGNAc (*O*-(2- acétamido- 2- déoxy- D-glucopyranosilidène)amino-*N*-phényl-carbamate) (Haltiwanger, 1998), dont les formules sont représentées figure 7.

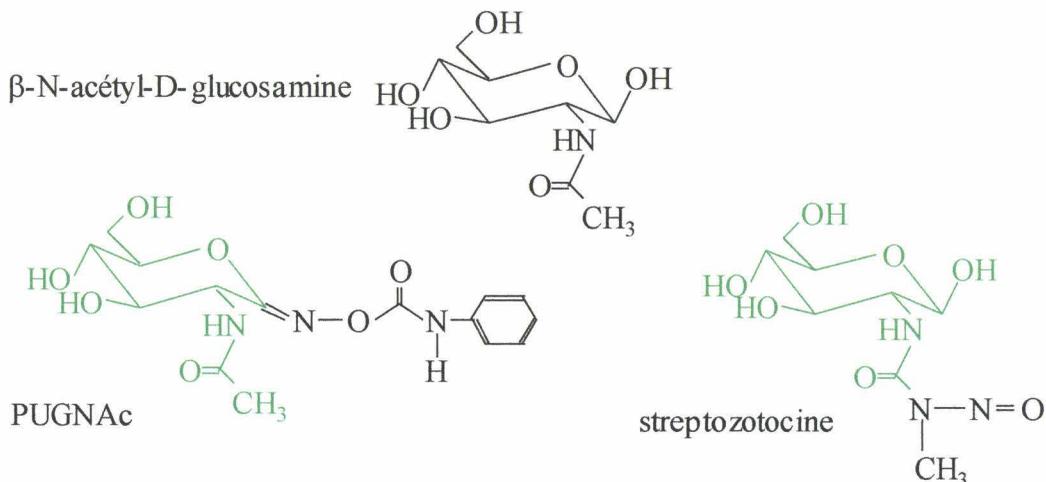


Figure 7 : Analogie structurale (en vert) entre la PUGNAc et la streptozotocine, inhibiteurs de la *O*-GlcNAcase, avec la *N*-acétyl- β -D-glucosamine.

L'enzyme purifiée existe sous forme d'un hétérodimère de 106 kDa, avec une sous-unité α de 54 kDa et une sous-unité β de 51 kDa. Les extrémités N- et C-terminales sont conservées à un haut degré, tandis que la région charnière est variable ; c'est l'extrémité C-terminale qui porte l'activité enzymatique (Wells et coll., 1994). Par ailleurs, la purification de la O-GlcNAcase du cerveau de vache a abouti à la purification d'un complexe multiprotéique de 600 kDa ; les protéines semblant être associées à la O-GlcNAcase sont des protéines de choc thermique (HSP110 et HSC70) et des transducteurs de signaux intracellulaires (amphiphisine et calcineurine) (Wells et coll., 1994).

III – Rôles de la O-GlcNAc.

Bien que le (ou les) rôle(s) exact(s) de la O-N-acétylglucosaminylation soit(ent) encore mal connu(s), de nombreuses études démontrent l'importance de la O-GlcNAc dans de nombreux processus cellulaires. En particulier, la O-GlcNAc jouerait un rôle dans le transport nucléaire, la régulation des interactions protéine-protéine, la régulation de la dégradation protéique ainsi que la régulation de l'activité d'un certain nombre de protéines, certaines de ces fonctions étant liée à l'antagonisme phosphorylation/O-GlcNAc.

A – Transport nucléaire.

1 – Généralités sur le transport nucléaire.

La membrane nucléaire est une double couche lipidique dont la membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique. Elle est « perforée » à de multiples endroits de complexes protéiques appelés pores nucléaires (NPC : nuclear pore complex). Les pores nucléaires sont des structures à symétrie octogonale composées d'un cylindre central associé à de grands filaments cytoplasmiques et présentant des prolongements dans le nucléoplasme (Fahrenkrog & Aebi, 2003). Le NPC est composé de plusieurs protéines différentes nommées nucléoporines.

Le pore nucléaire joue principalement un rôle de contrôle des échanges se produisant entre le cytosol et le noyau. Il existe cependant un certain degré de diffusion passive ; ainsi, les ions et molécules de masse moléculaire inférieure à 40 kDa peuvent diffuser librement à travers le pore nucléaire (Görllich & Kutay, 1999). Les protéines de masse moléculaire

supérieure à 40 kDa devant être importées dans le noyau possèdent une courte séquence peptidique nommée signal de localisation nucléaire ou NLS (NLS : nuclear localization signal). La protéine contenant le NLS va traverser le pore nucléaire en se fixant à un récepteur soluble de type importine, qui se liera au pore nucléaire et permettra le transport de la protéine à travers le NPC (Adam et coll., 1990). Outre le NLS, il existe d'autres signaux non-peptidiques permettant le transport du cytosol vers le noyau. C'est par exemple le cas des hnRNP, particules ribonucléiques hétérogènes (Piñol-Roma & Dreyfuss, 1993) ; les protéines, associées à un ARNm, sont transportées du noyau vers le cytosol. Les sucres peuvent également être un signal de transport vers le noyau. En effet, il a été démontré que la sérum albumine, protéine ne possédant pas de NLS, peut être transportée vers le noyau si elle porte des sucres spécifiques (Duverger et coll., 1993). Par ailleurs, l'étape énergie-dépendante du transport nucléaire est abolie en présence de WGA, lectine fixant les résidus de N-acétylglucosamine (Finlay et coll., 1987 ; Yoneda et coll., 1987). Par ailleurs, trois lectines nucléaires, pouvant être impliquées dans le transport cytosol-noyau, ont été caractérisées : la CBP35 (CBP : carbohydrate binding protein), fixant le galactose (Cowles et coll., 1989), ainsi que deux protéines fixant le glucose : CBP67 (Schröder et coll., 1992) et CBP70 (Sève et coll., 1993).

2 – *O*-GlcNAc et transport nucléaire.

Huit protéines du pore nucléaire sont *O*-GlcNAc : p45, p54, p58, p62, p100, p145, p180 et p210 (Holt et coll., 1987b ; Hanover et coll., 1987). Les protéines p62, p58 et p54 sont nécessaires à la formation du pore nucléaire. Ces protéines présentent de multiples sites de *O*-GlcNAc, dont pas moins de dix sites pour p180. Les résidus de *O*-GlcNAc portés par certaines protéines du pore nucléaire sont exposés à la fois vers les compartiments cytoplasmique et nucléoplasmique. Des anticorps ou des lectines interagissant avec les nucléoporines glycosylées interfèrent avec le transport nucléaire, en particulier au niveau de l'étape énergie-dépendante (Hanover, 2001). Il semble donc que la *O*-GlcNAc pourrait être une alternative au transport nucléaire dépendant du NLS . Cependant, le transport nucléaire ainsi que l'assemblage des protéines du pore nucléaire se produisent même lorsque les résidus de *O*-GlcNAc sont masqués par un résidu de galactose (Miller & Hanover, 1994).

Par ailleurs, les protéines du pore nucléaire sont à la fois glycosylées et phosphorylées. Il a été démontré que la phosphorylation des nucléoporines est régulée au cours du cycle cellulaire, tandis que la glycosylation est stable (Miller et coll., 1999). Ainsi, bien que

l'implication de la O-GlcNAc dans le transport nucléaire soit admise, sa fonction est encore mal comprise et reste donc fortement étudiée.

Une hypothèse récente s'appuie sur l'existence de lectines cytosoliques agissant comme navette entre le cytosol et le noyau (Guinez et coll., 2004). L'idée repose sur la formation de complexes multimériques de lectines permettant un pontage entre la protéine cytosolique modifiée par la O-GlcNAc à transporter et les protéines du pore nucléaire (figure 8). La protéine réalisant le pontage entre la protéine-O-GlcNAc à transporter et le pore nucléaire serait la protéine de choc thermique de 70 kDa ou HSP70.

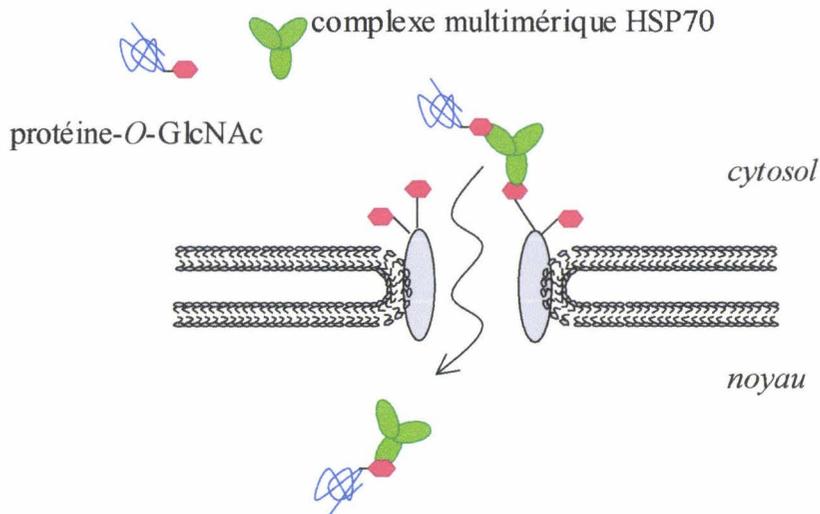


Figure 8 : Représentation schématique du transport cytosol-noyau impliquant une protéine-O-GlcNAc et un complexe multimérique d'HSP70 jouant le rôle de navette entre le cytosol et le noyau (d'après Guinez et coll., 2004).

B – Régulation des interactions protéine-protéine : le cas du cytosquelette.

De nombreuses protéines modifiées par la O-GlcNAc jouent des rôles clés dans l'organisation et l'assemblage du cytosquelette, incluant les cytokératines 8, 13 et 18 (Chou et coll., 1992 ; Chou & Omary, 1993), les neurofilaments H, L et M (Dong et coll., 1993 ; Dong et coll., 1996), les protéines associées aux microtubules MAP1, 2 et 4 (Ding & Vandré, 1996), les protéines fibrillaires de type 2 et 5 de l'adénovirus (Caillet-Boudin et coll., 1989), l'ankyrin G, la taline (Hagman et coll., 1992), la vinculine, la bande 4.1 des érythrocytes (Holt et coll., 1987a), la crystalline (Roquemore et coll., 1992 ; Roquemore et coll., 1996), la synapsine 1 (Luthi et coll., 1991 ; Cole & Hart, 1999) ainsi que la protéine Tau (Arnold et coll., 1996).

Les neurofilaments sont des filaments intermédiaires des neurones, jouant un rôle important dans la croissance et le maintien des axones myélinisés. Les neurofilaments de Mammifères sont constitués de trois polypeptides : NF-L, NF-M et NF-H, de masse moléculaire apparente 62, 145 et 200 kDa respectivement. Dong a identifié quatre sites de *O*-GlcNAc au niveau des neurofilaments : Thr²¹ et Ser²⁷ pour NF-L, et Thr⁴⁸ et Thr⁴³¹ pour NF-M (Dong et coll., 1993). Tous ces sites sont localisés dans le domaine tête, à l'exception du site Thr⁴³¹ de NF-M, localisé au début du domaine queue. Il est admis que le domaine tête joue un rôle important dans l'assemblage du filament (Gill et coll., 1990 ; Wong & Cleveland, 1990). La phosphorylation de ce domaine tête induit la dépolymérisation des filaments intermédiaires et prévient l'assemblage du filament. Une délétion incluant le site de *O*-GlcNAc provoque une agrégation périnucléaire des sous-unités NF-M, ainsi qu'un assemblage anormal des filaments.

La *O*-GlcNAc semble également jouer un rôle prépondérant dans l'organisation du cytosquelette par la modification des protéines associées aux microtubules. En effet, les microtubules sont l'un des composants majeurs du cytosquelette (Soltys & Gupta, 1992), et sont impliqués dans des fonctions cellulaires variées telles que la maintenance de la forme de la cellule, les mouvements des cils et des flagelles des Eucaryotes, la formation du fuseau mitotique, la régulation de la distribution des organelles et le mouvement vésiculaire. Il existe un groupe de protéines liées aux microtubules, définies comme les MAP ou microtubule-associated proteins, modifiant la dynamique et la fonction des microtubules. Les MAP de haut poids moléculaire (MAP1A, MAP1B, MAP2 et MAP4) et les MAP de bas poids moléculaire (protéine Tau) sont des protéines modifiées par la *O*-GlcNAc. La régulation de la fonction des MAP passe par la phosphorylation, en altérant leur affinité pour les microtubules, en affectant la stabilisation de ces MT (Olmsted, 1986), ou en régulant la dynamique des MT lors de la transition interphase → mitose (Ookata et coll., 1995).

C – O-GlcNAc, dégradation protéique et stress cellulaire.

1 – Rôle de la O-GlcNAc dans le(s) processus de dégradation cellulaire.

La protéolyse intracellulaire est une fonction cellulaire essentielle. Au-delà de ses rôles reconnus depuis longtemps, comme l'élimination des protéines anormales ou surnuméraires, elle assure aussi un rôle dont l'importance biologique n'a été que récemment

perçue dans la dégradation nécessaire et contrôlée de nombreuses protéines jouant un rôle dans des processus biologiques importants tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la réponse aux stimuli extracellulaires (Ciechanover & Schwartz, 1998).

Chez les Eucaryotes, l'un des acteurs majeurs de la protéolyse intracellulaire est le système multienzymatique ubiquitine/protéasome, qui fonctionne en deux grandes étapes grâce à une cascade enzymatique spécialisée (Hershko & Ciechanover, 1998). Le substrat est d'abord « marqué » par conjugaison covalente de chaînes d'ubiquitine (Ub), une petite protéine ubiquitaire très conservée de 76 acides aminés. Ces chaînes permettent ensuite la reconnaissance et la dégradation des molécules polyubiquitinylées par un complexe protéolytique de 2 000 kDa, le protéasome 26S (figure 9).

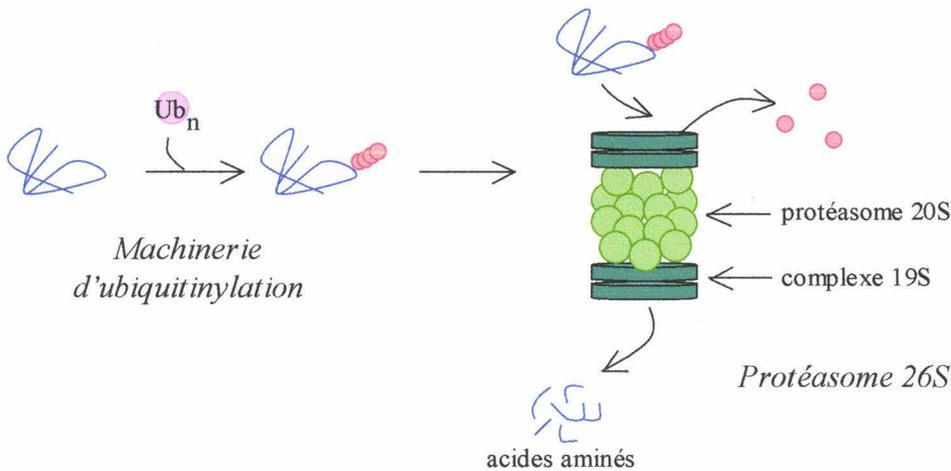


Figure 9 : Les étapes de la dégradation protéasomale des protéines polyubiquitinylées.

Il existe différents signaux à l'origine du marquage de la protéine par l'ubiquitine, en particulier l'identité de l'acide aminé N-terminal de la protéine (certains acides aminés étant « stabilisants », tels que la méthionine et la glycine, d'autres étant « déstabilisants », tels que la lysine, l'acide aspartique et le tryptophane), ainsi que la présence de séquences signal, en particulier de courtes séquences d'acides aminés KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) ou PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) (Rogers et coll., 1986 ; Rechsteiner & Rogers, 1996). Alors que certaines séquences PEST sont constitutives, d'autres nécessitent une activation par certains mécanismes tels que la phosphorylation. Il a été proposé que la O-GlcNAc bloquerait la phosphorylation de cette séquence PEST, protégeant ainsi la protéine de la dégradation par le protéasome. C'est par exemple le cas du récepteur murin des oestrogènes (Cheng et coll., 2000), mais également de la plakoglobine (Hatsell et coll., 2003). Nous pouvons également citer le cas de Sp1, facteur de transcription ubiquitaire intervenant dans la régulation de l'expression des gènes domestiques. Lorsque Sp1 est hypoglycosylé, notamment lors d'une

carence nutritionnelle, il est soumis à la dégradation protéasomale ; d'ailleurs, la forme hypoglycosylée de Sp1 n'est observable qu'en présence d'inhibiteurs du protéasome (Han & Kudlow, 1997).

Une étude récente a démontré une régulation du protéasome lui-même par l'intermédiaire de la O-GlcNAc, cette modification post-traductionnelle l'inhibant de manière réversible (Zhang et coll., 2003 ; Liu et coll., 2004 ; Zachara & Hart, 2004a).

2 – O-GlcNAc et chaperons moléculaires.

Différents chaperons s'associent avec le protéasome (Farras et coll., 2005), et des arguments fonctionnels impliquent les protéines de choc thermique HSC70, HSP70 ainsi que HSP90. Les chaperons moléculaires sont bien connus comme « machines » de remise en conformation des protéines agrégées ou dénaturées. Très tôt, ils ont été suspectés d'intervenir dans le contrôle de la dégradation de substrats divers (McClellan & Frydman, 2001 ; Glickman & Ciechanover, 2002).

Les protéines de choc thermique ou protéines de stress, communément appelées HSP (HSP : heat shock proteins), sont exprimées suite à toutes situations compromettant la survie cellulaire, telles que l'augmentation de température, l'exposition à des métaux lourds ou à des agents chimiques, l'hypoxie, l'anoxie, le manque de glucose ou encore les infections, assurant une protection de la cellule et une tolérance aux stress ultérieurs. Trois grandes familles de protéines de choc thermique, classées selon leur masse moléculaire, ont été décrites. Les HSP de petite taille (Arrigo & Welch, 1987 ; Behlke et coll., 1991), présentant un domaine très conservé connu sous le nom de domaine α B-crystalline, peuvent être phosphorylées en réponse à des stimuli variés (Crete & Landry, 1990 ; Landry et coll., 1992). Les protéines de choc thermique les plus étudiées sont les HSP de 70 kDa ; HSC70 représente la forme constitutive, et HSP70 la forme inductible. La troisième classe de protéines de choc thermique est HSP90 (Minami et coll., 1991). Toutes ces HSP présentent un haut degré d'homologie entre elles, et jouent un rôle de « chaperon » moléculaire, c'est-à-dire qu'elles préviennent les interactions inappropriées entre des protéines immatures ou anormales, empêchant ainsi leur agrégation et augmentant l'efficacité de leur remise en conformation. Plusieurs HSP sont modifiées par la O-GlcNAc ; c'est le cas de HSP70 (Walgren et coll., 2003 ; Guinez et coll., 2004), HSC70 (Lefebvre et coll., 2001), HSP90 (Wells et coll., 2002) et HSP27 ou α B-crystalline (Roquemore et coll., 1996).

3 – *O*-GlcNAc : un senseur du stress cellulaire ?

Le stress induit un signal cellulaire conduisant à la production de composants cellulaires permettant de limiter les effets délétères pour la cellule. Il a été démontré que le taux de *O*-GlcNAc est augmenté rapidement en réponse à différents stress (thermique, biologique et chimique), ce qui semble suggérer que la *O*-GlcNAc module la tolérance au stress, tandis qu'une diminution du taux de *O*-GlcNAc rend la cellule sensible au stress (Zacchara et coll., 2004b). De plus, l'activité de la *O*-GlcNAc transférase est accrue après un stress cellulaire, et l'expression de l'OGT est même augmentée lors d'un stress éthylique, osmotique ou oxydatif (Zacchara et coll., 2004b). Il semble également que cette augmentation de la tolérance au stress se fait via les protéines de choc thermique, permettant de préserver la structure des protéines. La *O*-GlcNAc pourrait alors jouer un rôle prépondérant dans la prévention de l'agrégation des protéines dénaturées suite à un stress cellulaire, puisque l'augmentation du taux de *O*-GlcNAc sur une protéine pourrait permettre sa reconnaissance par la protéine de choc thermique HSP70, lectine vis-à-vis du motif *O*-GlcNAc (Guinez et coll., 2004). Enfin, la modulation du taux de *O*-GlcNAc altère la synthèse des HSP70 et HSP40, la diminution du taux de *O*-GlcNAc résultant en une diminution de l'expression de ces deux protéines de choc thermique (Zacchara et coll., 2004b). Toutes ces données suggèrent donc que la *O*-GlcNAc pourrait jouer un rôle senseur du stress cellulaire en relation étroite avec les protéines de choc thermique.

D – Régulation de l'expression des protéines.

1 – Contrôle de la transcription.

Remodelage de la chromatine.

De nombreuses protéines localisées au niveau des chromosomes contiennent de hauts taux de *O*-GlcNAc (Kelly & Hart, 1989), et toutes les classes de protéines associées à la chromatine sont modifiées par la *O*-GlcNAc.

Or, le remodelage de la chromatine, dans lequel les modifications post-traductionnelles ont une part importante, est corrélé avec la transition d'une chromatine « inactive » du point de vue transcriptionnel (chromatine fermée) en une chromatine « active » (chromatine ouverte). La *O*-GlcNAc pourrait donc jouer un rôle important dans la

régulation des différentes étapes du processus d'activation de la transcription.

ARN polymérase II.

L'ARN polymérase existe sous deux formes distinctes : la forme IIO, dont le domaine C-terminal (CTD : C-terminal domain) très conservé est considérablement phosphorylé sur des résidus de sérine et de thréonine, et la forme IIA, non phosphorylée. En revanche, cette forme IIA est fortement modifiée par la O-GlcNAc, tandis qu'il n'a été détecté aucun motif O-GlcNAc sur la forme IIO (Kelly et coll., 1993 ; Comer & Hart, 2001). Lors de la formation du complexe d'initiation, l'ARN pol II n'est pas phosphorylé. La phosphorylation du CTD de l'ARN pol II par des kinases spécifiques permet la transition de la phase d'initiation à la phase d'élongation, la phosphorylation jouant un rôle important dans l'interaction de l'ARN pol II avec certains facteurs d'élongation (Steinmetz, 1997). Ainsi, la glycosylation du CTD pourrait prévenir l'association prématurée de l'ARN pol II avec les facteurs d'élongation, ou alors interagir avec des inhibiteurs de la transcription. Une autre possibilité serait que la forme glycosylée de l'ARN pol II puisse interagir avec des facteurs de transcription lors de l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription.

Facteurs de transcription.

Au niveau des facteurs c-myc, Sp1 et du récepteur murin des œstrogènes, la glycosylation semble stabiliser le facteur de transcription (Chou et coll., 1995a ; Han & Kudlow, 1997 ; Cheng & Hart, 2000 ; Cheng et coll., 2000). D'autre part, l'augmentation de la glycosylation de Sp1 diminue sa capacité de transactivation, tandis que Sp1 phosphorylé se fixe à l'ADN (Jackson & Tjian, 1988).

La protéine c-Myc est également modifiée par la O-GlcNAc au niveau de la Thr⁵⁸ (Chou et coll., 1995b). La phosphorylation de Thr⁵⁸ et/ou Ser⁶² module la transactivation et la co-transformation (Albert et coll., 1994 ; Pulverer et coll., 1994) par c-Myc. Il existe une réciprocité entre la phosphorylation et la O-GlcNAc au niveau d'un acide aminé biologiquement important pour l'activité de la protéine (le résidu Thr⁵⁸), pouvant donc moduler les fonctions de la protéine c-Myc.

Gao démontre en 2003 que le facteur de transcription PDX-1, l'un des facteurs de transcription les plus importants intervenant dans la sécrétion d'insuline, est modifié par la O-GlcNAc, la glycosylation de PDX-1 augmentant sa capacité de fixation à l'ADN (Gao et coll., 2003). Au contraire, la forme non-glycosylée des facteurs de transcription Hnf-1 et p53 correspond à la forme se fixant à l'ADN (Comer & Hart, 1999). Il semble donc que la O-

GlcNAc n'influe par exclusivement sur la capacité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription, mais elle peut jouer sur les phénomènes d'interactions protéine-protéine avec les protéines modulatrices.

Il a été démontré que l'OGT, responsable du transfert du résidu *O*-GlcNAc sur des protéines cibles, interagit avec le complexe histone désacétylase en se fixant sur le corépresseur mSin3A, l'OGT et mSin3A réprimant coopérativement la transcription en parallèle de la désacétylation des histones (Yang et coll., 2002).

2 - Contrôle de la traduction.

L'initiation de la synthèse protéique requiert la reconnaissance du codon AUG d'un ARNm par un ribosome portant l'ARN de transfert initiateur chargé d'un résidu de méthionine. Chez les Eucaryotes, l'initiation s'opère en trois étapes : la formation d'un complexe de pré-initiation, sa liaison à l'ARNm, et enfin son positionnement sur le codon initiateur. L'intégrité de ce mécanisme dépend d'une série d'interactions moléculaires entre les différents facteurs.

Le facteur d'initiation de la traduction eIF-2 est un élément très important dans la régulation de la traduction des protéines ; la phosphorylation de eIF-2 par des kinases inhibe la synthèse protéique. Une protéine de 67 kDa (nommée p⁶⁷) s'associant à eIF-2 a été identifiée comme étant modifiée par la *O*-GlcNAc (Datta et coll., 1989) ; cette protéine empêche la phosphorylation de eIF-2, et donc, ce faisant, prévient de l'inhibition de la traduction. Ce n'est qu'après déglycosylation de p67 que eIF-2 se dissocie de p67 et peut alors être phosphorylé.

IV - Implication de la O-GlcNAc dans la régulation cellulaire.

A - Transduction cellulaire.

Les taux de *O*-GlcNAc sont modifiés en réponse aux facteurs mitogènes et aux facteurs de croissance, ainsi que dans la signalisation cellulaire ou encore en fonction des stades de développement cellulaires (Kearse & Hart, 1991b ; Chou et coll., 1992 ; Chou & Omary, 1993 ; Slawson et coll., 2002 ; Kamemura & Hart, 2003 ; Walgren et coll., 2003). Il a également été démontré que, de la même manière que la phosphorylation, le turn-over du

monosaccharide est beaucoup plus rapide que le squelette protéique auquel il est attaché. Ces changements de *O*-GlcNAc induisent différents effets fonctionnels au niveau des protéines, tels qu'une régulation de l'activité des protéines, une régulation des interactions protéine-protéine, une activité de fixation à l'ADN, une localisation cellulaire particulière, une modulation de la durée de vie... Le mécanisme moléculaire par lequel la *O*-GlcNAc assure ces différentes fonctions est encore mal compris. Néanmoins, de nombreuses lectines vis-à-vis de ce motif *O*-GlcNAc ont été identifiées, telles que l'HSC70 (Lefebvre et coll., 2001), l'HSP70 (Guinez et coll., 2004), la CBP70 (Felin et coll., 1994), la CGB70 (Botti et coll., 2003) et les amelogénines (Ravindranath et coll., 1999). Ces données suggèrent un rôle important de la *O*-GlcNAc dans la régulation des interactions protéine-protéine, analogue à la phosphorylation de résidus de sérine et de thréonine permettant les interactions entre certains domaines protéiques (Pawson & Scott, 1997 ; Yaffe & Smerdon, 2001).

Il y a une dizaine d'années, l'hypothèse que la *O*-GlcNAc puisse participer à la transduction d'un signal cellulaire a été émise (Hart et coll., 1995), mais son implication dans la cascade de transduction reste encore mal comprise. Certains travaux confirment l'intervention de la *O*-GlcNAc dans la cascade de signalisation de l'insuline, avec un défaut de l'activation par l'insuline ainsi que de l'activation de eNOS (endothelial nitric oxide synthase) attribués à l'augmentation du taux de *O*-GlcNAc (Du et coll., 2001 ; Federici et coll., 2002). Divers autres travaux suggèrent également un rôle de la *O*-GlcNAc dans les voies de signalisation cellulaires, en particulier les travaux réalisés sur la E-cadhérine, la β -caténine, la PKA et la voie NF- κ B (Griffith & Schmitz, 1999 ; Zhu et coll., 2001 ; Vosseler et coll., 2002a ; James et coll., 2002). Il existe également quelques éléments suggérant l'intervention de la *O*-GlcNAc dans l'apoptose, en particulier le clivage de la *O*-GlcNAcase par la caspase-3 (Wells et coll., 2002), l'augmentation de la *O*-GlcNAc inhibant l'activation de l'anti-apoptotique Akt et inversement (Boehmelt et coll., 2000 ; Vosseler et coll., 2002b), ainsi que l'implication de la voie de synthèse des hexosamines dans la mort des cellules β pancréatiques et la dégénération des neurones rétinaux (Liu et coll., 2000 ; Nakamura et coll., 2001).

Exemple de la voie de signalisation de l'insuline.

Au niveau cellulaire, l'insuline stimule le transport du glucose en induisant la translocation de vésicules contenant un transporteur spécifique du glucose, GLUT4, d'un pool intracytoplasmique vers la membrane cellulaire (Cushman & Wardzala, 1980 ; Suzuki &

Kono, 1980). L'augmentation du nombre de transporteurs à la surface cellulaire va permettre l'entrée de glucose dans la cellule suivant son gradient de concentration. La transmission du signal de l'insuline est schématisé figure 10.

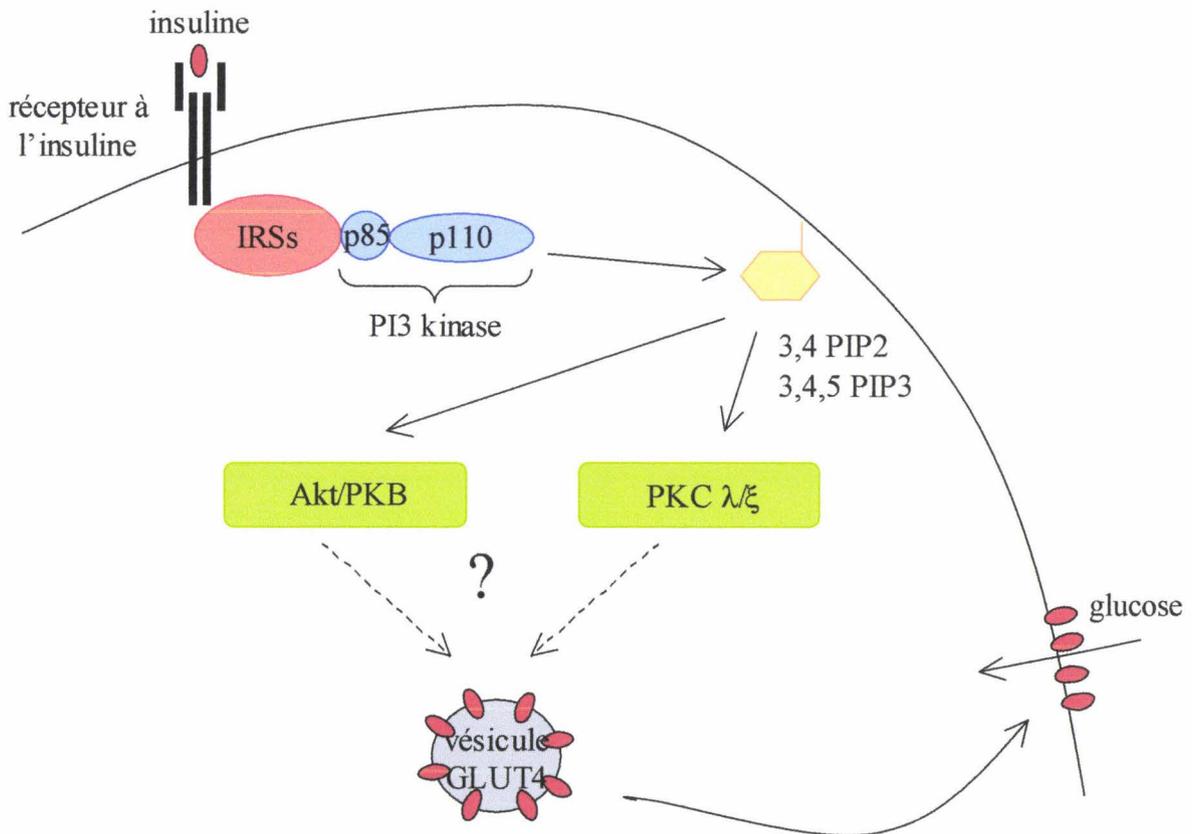


Figure 10 : Représentation schématique de la voie de signalisation à l'insuline.

L'insuline agit en se liant à son récepteur au niveau de la membrane cellulaire ; après liaison de l'hormone, le récepteur est auto-phosphorylé, entraînant la phosphorylation de résidus de tyrosine sur des protéines intracellulaires : les protéines IRS (IRS : insulin receptor substrate) et Shc. Les résidus phosphotyrosines vont permettre l'interaction et l'activation de protéines requises pour la propagation du signal. L'activation de la phospho-inositide-3-kinase (PI3 kinase) est reconnue actuellement comme étant essentielle dans la réponse métabolique de l'hormone, puisque l'inhibition de la PI3 kinase bloque complètement l'entrée de glucose dans la cellule en réponse à l'insuline. La PI3 kinase, par phosphorylation de phosphoinositides, stimule plusieurs protéines intracellulaires, dont la sérine/thréonine kinase Akt ou PKB (Tanti et coll., 1997 ; Wang et coll., 1999), ainsi que certains membres des protéines kinase C atypiques (PKC λ et ξ) (Standaert et coll., 1997 ; Kotani et coll., 1998), impliquées dans la voie de signalisation métabolique de l'hormone. Par la suite, les étapes de signalisation menant à la translocation des vésicules de GLUT4 sont encore mal connues.

La PUGNAc induit des modifications au niveau des protéines de la cascade de signalisation de l'insuline. Alors que l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et la tyrosine phosphorylation de IRS-2 ne sont pas touchées lors de l'inhibition de la O-GlcNAcase, la phosphorylation en aval d'Akt (au niveau de la Thr³⁰⁸) et de la glycogène synthase kinase 3 β (au niveau de la Ser⁹) est inhibée (Vosseler et coll., 2002b) ; la résistance à l'insuline induite par la PUGNAc conduit également à la modification par la O-GlcNAc de IRS-1 et de la β -caténine, deux protéines effectrices importantes dans la voie de signalisation de l'insuline (Patti et coll., 1999 ; Zhu et coll., 2001), ainsi qu'à une diminution du nombre de transporteurs de glucose GLUT4 (Park et coll., 2005).

L'insuline, en activant la voie PI3-kinase/Akt, conduit à l'inhibition de la glycogène synthase kinase et donc à l'activation de la glycogène synthase (celle-ci étant inhibée par la phosphorylation) (Shulman et coll., 1995 ; Lawrence & Roach, 1997). Il a été démontré que la glycogène synthase est également modifiée par la O-GlcNAc (Parker et coll., 2003), et que son taux de glycosylation augmente lorsque la cellule est traitée par des concentrations élevées en glucose et par la glucosamine ; la glycosylation inhibe l'enzyme de manière analogue à la phosphorylation, et c'est seulement après élimination du motif O-GlcNAc que l'enzyme peut être pleinement activée par la protéine phosphatase 1 (Parker et coll., 2003 ; Parker et coll., 2004).

B – Senseur nutritionnel.

Le sucre donneur de la O-GlcNAc est l'UDP-GlcNAc, synthétisé par la voie des hexosamines. Le taux d'UDP-GlcNAc dépend du taux de glucose entré dans la cellule, puisque 2 à 5 % du glucose entrant dans la cellule est dirigé vers la voie de biosynthèse des hexosamines, qui dépend donc de l'état nutritionnel de la cellule ; la concentration en UDP-GlcNAc est également modulée par les autres métabolites (acides gras, acides aminés et nucléotides). Or, le taux d'UDP-GlcNAc influe sur la modification des protéines par la O-GlcNAc, puisque l'activité de l'OGT est modifiée par la concentration en sucre donneur (Kreppel & Hart, 1999). En modulant les taux de O-GlcNAc selon son état nutritionnel, la cellule peut ainsi exercer un rétrocontrôle négatif sur l'import de glucose, notamment par la voie de signalisation mTor (McDaniel et coll., 2002), par la voie de l'AMP kinase (Hardie, 2004), mais également par la voie de la PI-3-kinase/Akt/PKB (Whiteman et coll., 2002).

C – Dérégulation de la O-GlcNAc : une implication possible dans certaines pathologies.

1 – Cancer.

De nombreuses données suggèrent une implication plus ou moins directe de la O-GlcNAc dans le processus de cancérisation. En effet, des suppresseurs de tumeur ont été identifiés comme étant modifiés par ce type de glycosylation. C'est en particulier le cas de la protéine p53 (Shaw et coll., 1996), qui permet de bloquer transitoirement, dans une cellule « normale », la division cellulaire au stade G1 lorsque le génôme est altéré. C'est la pause réparatrice, permettant à l'ADN d'être « réparé », avant que la cellule ne se divise à nouveau ; si l'ADN n'est pas réparable, la cellule est conduite en apoptose.

La protéine c-Myc, produit du proto-oncogène *c-myc*, est une phosphoprotéine nucléaire jouant un rôle critique dans la régulation génique de cellules normales et néoplastiques. Des mutations de *c-myc* sont associées à différents types de tumeurs (Kato & Dang, 1992). La glycosylation et la phosphorylation de c-Myc sont mutuellement exclusives au niveau d'un même site, la thréonine 58, celui-ci étant impliqué dans le lymphome de Burkitt (Chou et coll., 1995b).

Il existe également des changements de glycosylation au niveau de protéines spécifiques intervenant dans la division cellulaire, lors de la phase M. En effet, il y a augmentation du taux de O-GlcNAc sur les cytokératines des cellules HT29 (cellules cancéreuses du côlon humain) bloquées en phase M lors d'un traitement au nocodazole (Haltiwanger & Philipsberg, 1997). Enfin, des études réalisées sur des cellules primaires du cancer du sein mettent en évidence une diminution du taux global de O-GlcNAc, liée à une augmentation de l'activité O-GlcNAcase (Slawson et coll., 2001). Cette étude suggère que, lors de la transition d'une cellule normale à une cellule maligne, la régulation de la O-GlcNAc est perturbée, conduisant à une diminution de la O-GlcNAc associée à une croissance cellulaire aberrante.

Outre la modification par la O-GlcNAc de protéines impliquées dans le processus de cancérisation, des données récentes montrent une implication de la O-GlcNAc dans la division cellulaire. La O-GlcNAc jouerait en effet un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire (Slawson et coll., 2005), par la régulation des événements de phosphorylation et d'expression des cyclines et la division cellulaire. Par ailleurs, une injection de galactosyl transférase dans le cytoplasme d'ovocytes de *Xenopus laevis* est létale pour la cellule (Fang

& Miller, 2001), en particulier en phase M par inhibition de la formation de l'aster de microtubules. Par ailleurs, une incubation des ovocytes en présence de glucose, de glucosamine ou de PUGNAc, inhibiteur de la O-GlcNAcase, ralentit la maturation des ovocytes (Slawson et coll., 2002), l'effet du glucose étant aboli lorsque les cellules sont incubées en présence de 6-diazo-5-oxonorleucine (DON), inhibiteur de la GFAT, enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines. Boelmelt a démontré qu'une diminution du taux d'UDP-GlcNAc, conduisant ultérieurement à une diminution du taux de O-GlcNAc, abroge la progression du cycle cellulaire (Boelmelt et coll., 2000) ; en effet, les cellules déficientes en glucosamine-6-phosphate acétyltransférase, une enzyme de la voie de biosynthèse des hexosamines, ont un défaut de prolifération et d'adhésion, ces déficiences pouvant être abolies lors de la réexpression de l'enzyme ou par restauration du pool intracellulaire d'UDP-GlcNAc.

Les cellules tumorales présentent un métabolisme glycolytique altéré ; en effet, les cellules transformées passent d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme glycolytique, où l'énergie nécessaire à la division cellulaire provient de la glycolyse : c'est l'effet « crabtree » (Wojtczak, 1996). Il est donc clair, de par le rôle central du glucose dans le métabolisme de la O-GlcNAc, que cette modification post-traductionnelle puisse jouer une fonction essentielle dans cet effet « crabtree ». Ces données suggèrent donc que la régulation par la O-GlcNAc est importante pour la progression du cycle cellulaire, et donc qu'une altération du métabolisme de la O-GlcNAc pourrait être impliquée dans les pathologies découlant de divisions cellulaires anormales.

2 – Maladies neurodégénératives.

La O-GlcNAc est abondante dans le cerveau, en particulier au niveau de protéines du cytosquelette telles que les neurofilaments, les protéines associées aux microtubules, ou encore les protéines d'assemblage de la clathrine (Dong et coll, 1996 ; Yao & Coleman, 1998). Un intérêt particulier peut être porté à la protéine Tau et au précurseur du β -amyloïde ; dans le cas de la maladie d'Alzheimer, deux processus dégénératifs différents, faisant intervenir les protéines citées précédemment, se conjuguent pour provoquer la dégénérescence des cellules nerveuses :

- le premier processus, l'amyloïdogénèse ou pathologie APP, correspond à un dysfonctionnement du précurseur du β -amyloïde. Cette protéine, présente dans

toutes les cellules de toutes les espèces, joue un rôle important dans la survie neuronale au sein du tissu cérébral ;

- le deuxième processus correspond à l'agrégation de la protéine Tau sous forme de filaments pathologiques dans les cellules nerveuses ; c'est le processus de dégénérescence neurofibrillaire.

La protéine précurseur du β -amyloïde est modifiée par la *O*-GlcNAc (Griffith et coll., 1995), de même que la protéine Tau (Arnold et coll., 1996). De plus, la protéine Tau est modifiée par plusieurs motifs *O*-GlcNAc dans le cerveau normal (Arnold et coll., 1996) ; elle est au contraire hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer, tandis que le précurseur du β -amyloïde est hypoglycosylé (Alonso et coll., 1997). L'hyperphosphorylation aboutit à l'incapacité des protéines Tau à se lier aux microtubules ; cet état anormal de phosphorylation peut s'expliquer soit par une augmentation de l'activité des kinases, soit par une diminution de l'activité des phosphatases (Buée et coll., 2000 ; Brion et coll., 2001). Dans le neurone, la déstabilisation des microtubules perturbe les fonctions vitales de la cellule, telles que le transport axonal, ce qui conduit à la dégénérescence du neurone. D'autres études montrent un défaut du métabolisme du glucose dans le cerveau de malades atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces données ont conduit à la formulation d'une hypothèse intéressante, dans laquelle le défaut du métabolisme du glucose conduirait à une diminution du taux d'UDP-GlcNAc avec pour conséquence une diminution du taux de *O*-GlcNAc. La modification des activités kinases et phosphatases associées aux variations du taux de *O*-GlcNAc conduirait à une hyperphosphorylation de la protéine Tau, conduisant ultérieurement à la déstabilisation des neurones.

Enfin, il est intéressant de noter que la localisation chromosomique de la *O*-GlcNAc transférase correspond à un locus impliqué dans le développement de maladies neurodégénératives ; en effet, le gène de l'OGT est localisé à proximité du gène impliqué dans la dystonie de Parkinson liée au chromosome X (Shafi et coll., 2000).

3 – Diabète de type II.

La résistance à l'insuline, associée à un défaut de sécrétion pancréatique d'insuline en réponse au glucose, joue un rôle important dans le développement du diabète de type II ; elle peut également être liée à un défaut d'action de l'hormone dans ses tissus cibles, en particulier le muscle squelettique. Les travaux de Marshall ont permis d'établir un lien entre la voie de biosynthèse des hexosamines et la résistance à l'insuline (Marshall et coll., 1991). Différents

facteurs induisent à des degrés variables le diabète de type II : l'hyperglycémie, l'augmentation des acides gras libres, une surexpression de la GFAT ainsi que l'élévation du taux de glucosamine. Ces facteurs induisent une augmentation du flux métabolique à travers la voie de biosynthèse des hexosamines. Comme la *O*-*N*-acétylglucosaminylation est elle-même dépendante de la voie de biosynthèse des hexosamines, il a donc été proposé que la *O*-GlcNAc puisse être un médiateur du diabète de type II. D'ailleurs, des taux élevés de *O*-GlcNAc sont retrouvés dans les cellules de rats diabétiques, dans les adipocytes 3T3-L1, ainsi que dans les plaques athérosclérotiques de patients diabétiques (McClain et coll., 2002). La GFAT semble donc jouer un rôle pivot dans le phénomène de résistance à l'insuline ; ainsi, des souris transgéniques surexprimant la GFAT sont résistantes à l'insuline (Hebert et coll., 1996). Marshall a également démontré que l'azasérine, inhibiteur de la GFAT, reverse l'hyperglycémie induite par la résistance à l'insuline, tandis que la glucosamine, entrant dans la voie de biosynthèse des hexosamines en aval de la GFAT, potentialise la résistance à l'insuline, et ce avec un effet de l'ordre de 40 fois plus important que le glucose (Marshall et coll., 1991). L'effet inhibiteur de l'entrée de glucose, médié par l'insuline et exercé par la glucosamine, est lié à l'accumulation d'UDP-hexosamines, dont l'UDP-GlcNAc, produits finaux de la voie de biosynthèse des hexosamines (Hawkins et coll., 1997). L'influence de la *O*-GlcNAc dans l'induction de la résistance à l'insuline et son intervention dans la voie de signalisation de l'hormone est représentée schématiquement figure 11.

Il existe une étroite corrélation entre l'élévation du taux de *O*-GlcNAc induite par la PUGNAc et le phénomène de résistance à l'insuline. Cet inhibiteur de la *O*-GlcNAcase induit une augmentation du taux de *O*-GlcNAc au niveau des protéines nucléo-cytoplasmiques ; suite à ce seul traitement à la PUGNAc, les adipocytes 3T3-L3 deviennent résistants à l'action de l'insuline (Vosseler et coll., 2002b), alors que l'infusion de glucosamine nécessite un traitement chronique par l'insuline pour permettre l'induction de la résistance à l'insuline (Thomson et coll., 1997).

L'inhibition de la voie de synthèse des hexosamines prévient de la résistance à l'insuline induite par l'hyperglycémie dans les tissus périphériques (Marshall et coll., 1991) ; il a également été démontré que des souris résistantes à l'insuline présentent des taux élevés de *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique (Yki-Jarvinen et coll., 1998). Par ailleurs, l'élévation du taux de *O*-GlcNAc via l'inhibition de la *O*-GlcNAcase conduit à une déficience de l'entrée de glucose insulino-dépendante dans les adipocytes 3T3-L1 (Haltiwanger et coll., 1998). Il est donc clair qu'il existe une corrélation entre le taux de *O*-GlcNAc et la résistance

à l'insuline ; cette résistance à l'insuline liée à l'augmentation du taux de O-GlcNAc se fait via un défaut d'activation d'Akt (Vosseler et coll., 2002b ; McClain et coll., 2002)

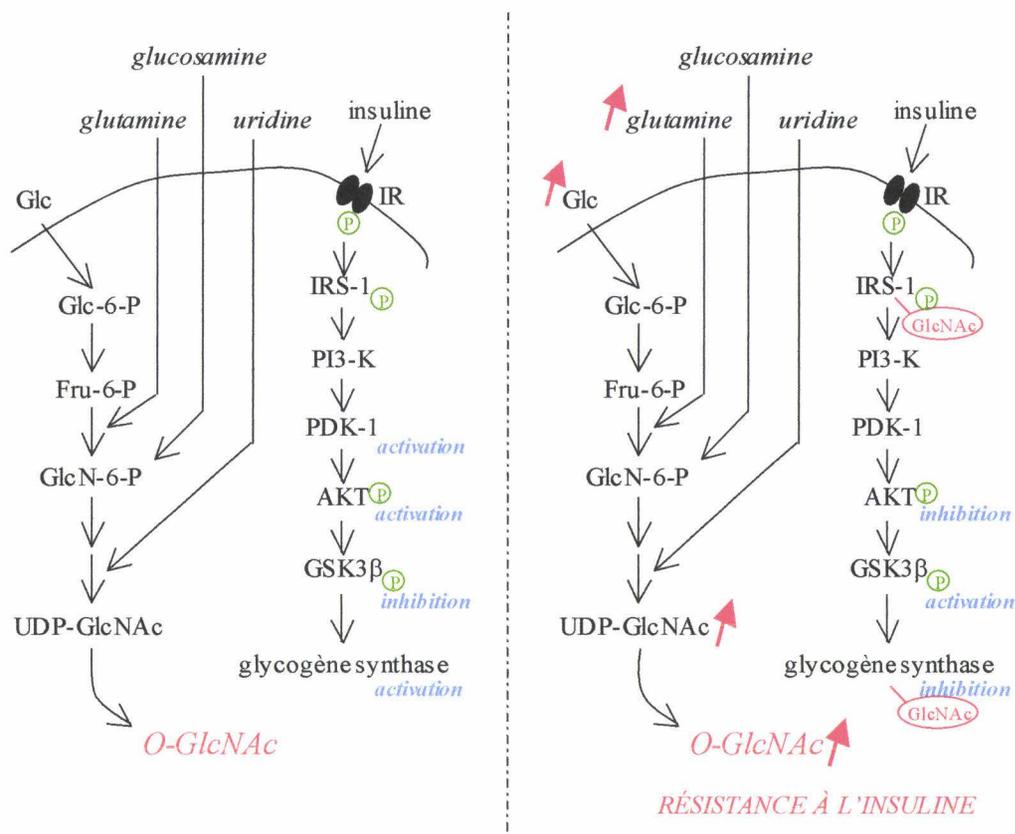


Figure 11 : Influence de la O-GlcNAc dans l'induction de la résistance à l'insuline et son intervention dans la voie de signalisation de l'hormone.

La fonction primaire des cellules β -pancréatiques est de sécréter l'insuline en réponse à la concentration sanguine en glucose afin de conserver l'homéostasie. Dans le diabète de type II, les cellules β -pancréatiques perdent la capacité à délivrer la quantité adéquate d'insuline en réponse à la concentration sanguine en glucose. Cet état d'intolérance au glucose conduit à la détérioration des cellules β via la toxicité au glucose, et a des conséquences délétères telles que le stress oxydatif et l'apoptose ; certaines études mettent en cause la voie de biosynthèse des hexosamines (Tang et coll., 2000 ; Kaneto et coll., 2001). L'hypothèse d'un rôle de la O-GlcNAc dans l'apoptose des cellules β -pancréatiques glucose-induite a été soulevée en raison de l'abondance de la O-GlcNAc transférase dans les cellules β , et par le fait que la streptozotocine, analogue de la N-acétylglucosamine bloquant

spécifiquement l'hydrolyse des résidus *O*-GlcNAc d'une protéine, est toxique pour les cellules β (Liu et coll., 2000).

Cependant, il existe des études contradictoires ne mettant pas directement en cause la *O*-N-acétylglucosaminylation dans la destruction des cellules β -pancréatiques, mais plutôt un stress oxydatif lié à l'activation de la voie de biosynthèse des hexosamines. Ce processus, en conjonction avec une activité diminuée de la glucokinase et à l'influx de glucose, conduit rapidement la cellule à un état de privation et à la mort cellulaire. Cependant, bien qu'il semble que l'action diabétogénique de la streptozotocine ne soit pas directement liée à l'inhibition de la *O*-GlcNAcase, et que la streptozotocine agisse comme donneur d'oxyde nitrique ; cependant, d'autres donneurs de NO, tels que la N-méthyl-N-nitrosourée, sont sans effet toxique pour les cellules β (Wilson & Leiter, 1990 ; Eizirik et coll., 1991 ; Kroncke et coll., 1995). Ainsi, bien qu'il semble évident que la voie de biosynthèse des hexosamines ainsi que la *O*-GlcNAc interviennent dans la régulation de la sécrétion d'insuline et dans la mort des cellules β -pancréatiques, les données quant à leur rôle et à leur implication dans le diabète de type II sont contradictoires et restent à élucider.

Deuxième partie

*Le muscle
squelettique*

I – Introduction.

On distingue trois types de muscles : les muscles lisses, assurant les fonctions vitales indépendantes de notre volonté, le muscle cardiaque, pompe vitale assurant la circulation sanguine dans notre organisme, et les muscles squelettiques ou muscles striés. En terme de taille absolue, l'organe le plus développé du corps humain et des autres Vertébrés est le muscle squelettique ; en effet, les muscles striés constituent 40 à 50 % de la masse totale du corps. Leur fonction principale consiste à produire un travail en se contractant. Les muscles squelettiques de notre organisme exercent plusieurs fonctions importantes :

- ils produisent le mouvement. Les muscles squelettiques assurent la locomotion et la préhension, et permettent de réagir rapidement aux évènements survenant dans l'environnement. Ces mouvements sont volontaires ;
- ils permettent le maintien de la posture. Le fonctionnement des muscles squelettiques déterminant notre posture atteint rarement le seuil de la conscience. Leur action est cependant presque constante : ils effectuent sans cesse des ajustements infimes grâce auxquels nous pouvons conserver notre position assise ou debout intégrant l'effet omniprésent de la force gravitationnelle ;
- ils stabilisent les articulations. Au cours même de la traction qu'ils exercent pour déplacer les os, les muscles stabilisent les articulations du squelette.

II – Anatomie macroscopique et microscopique du muscle squelettique.

A – 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 périmysium. 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. Les différents niveaux d'organisation du muscle strié sont représentés figure 12.

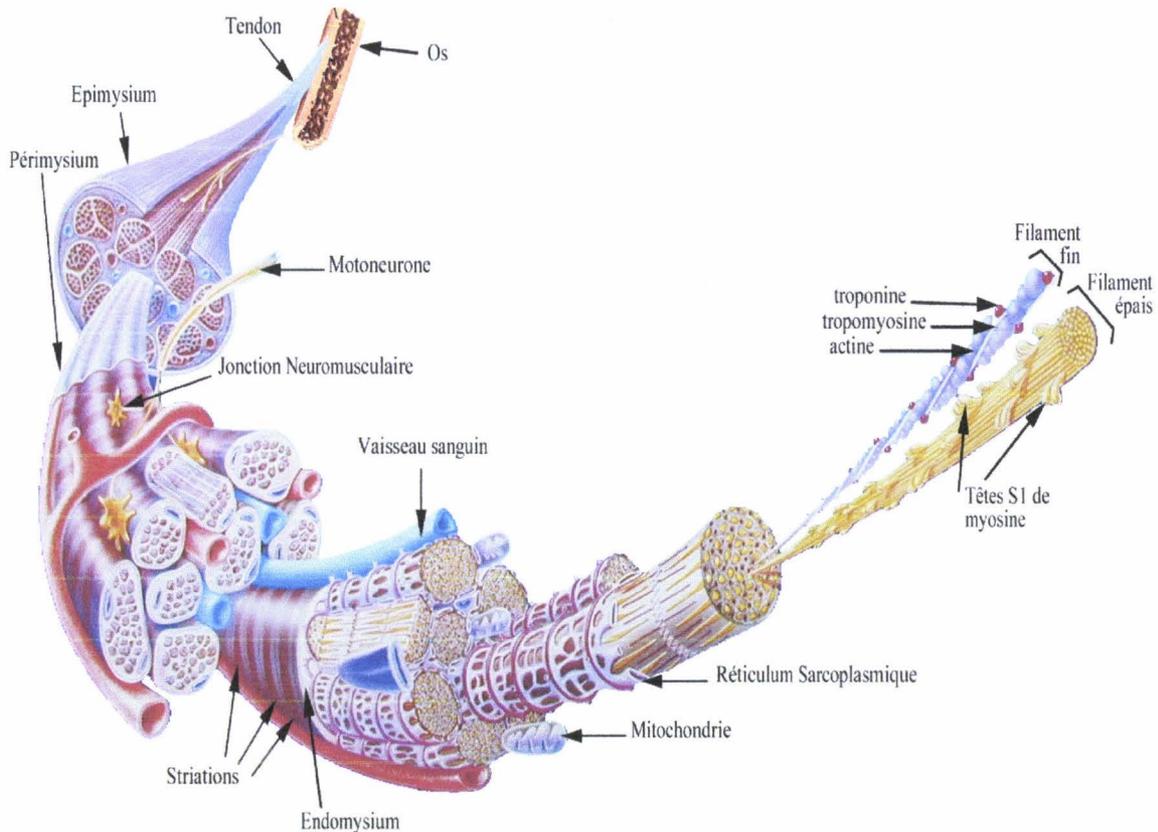


Figure 12 : Les différents niveaux d'organisation du tissu musculaire strié, du muscle squelettique à la myofibrille.

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 à 40 mm, et leur diamètre se situe entre 10 et 100 μm .

B – Organisation microscopique.

A l'échelle microscopique, la fibre musculaire contient des milliers de longues structures cylindriques appelées myofibrilles, qui sont des 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 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 13.

Sur la longueur de chaque myofibrille, on remarque une alternance de bandes foncées (bandes A) et de bandes claires (bandes I). Dans une fibre musculaire intacte, les bandes des myofibrilles sont presque parfaitement alignées, et se poursuivent sur toute la longueur de la cellule ; c'est pour cette raison que l'ensemble du muscle paraît strié.

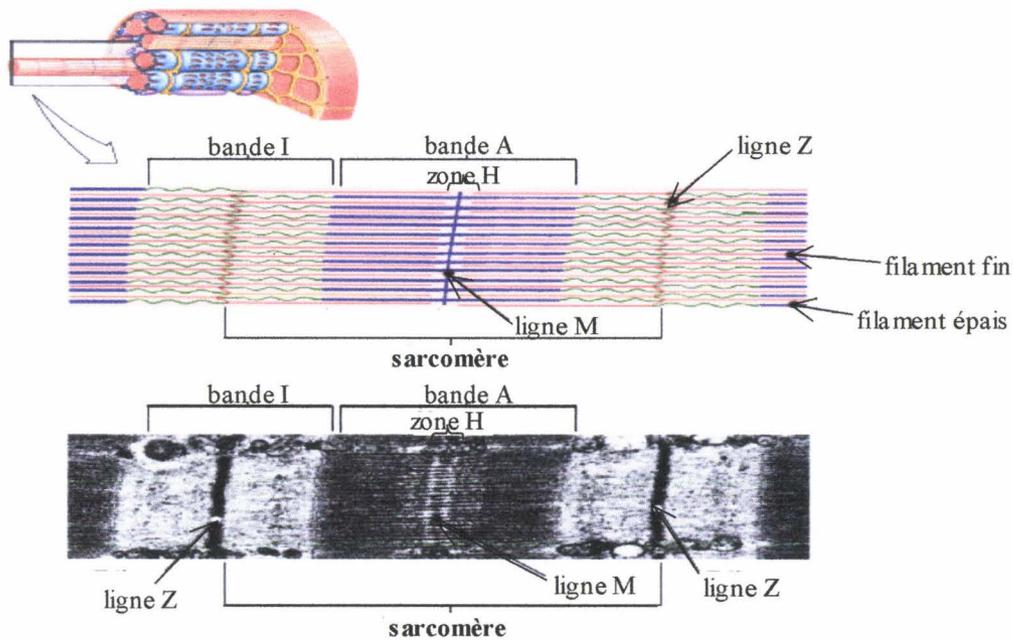


Figure 13 : Organisation microscopique du muscle squelettique : le sarcomère.

La zone H, 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 placés bout à bout. Au niveau moléculaire, on constate que les stries des myofibrilles sont formées par la disposition ordonnée de deux types de filaments de protéines, ou myofilaments, à l'intérieur des sarcomères : les filaments fins et les filaments épais.

III – Structure et composition moléculaire des myofilaments.

A – Filaments épais de myosine.

1 – Structure de la myosine.

La myosine est une protéine asymétrique et hexamérique en forme de club de golf, constituée de deux chaînes lourdes d'approximativement 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 partie N-terminale de chaque chaîne lourde forme une tête globulaire de telle manière que chaque molécule de myosine contienne deux têtes (figure 14). 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.

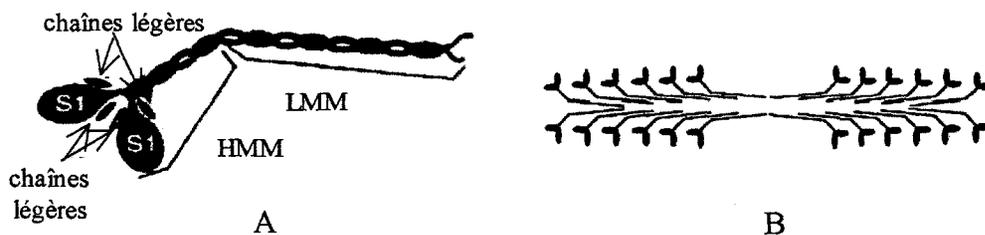


Figure 14 : (A) Structure hexamérique de la myosine. (B) Organisation des filaments épais de myosine.

Au niveau du sarcomère, on compte environ 300 molécules de myosine formant les filaments épais, de 1,5 μm de longueur et de 15 nm de diamètre.

2 – Chaînes lourdes de myosine (MHC : myosin heavy chain).

Au niveau des chaînes lourdes de myosine, un clivage enzymatique par la trypsine (Lowey et coll., 1969) permet la séparation de la myosine en une queue ou méromyosine légère notée LMM (LMM : light meromyosin) et une partie globulaire ou méromyosine lourde notée HMM (HMM : heavy meromyosin). Cette partie globulaire peut elle-même être

clivée par la papaïne en une tête S1 globulaire et 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 à la partie moteur.

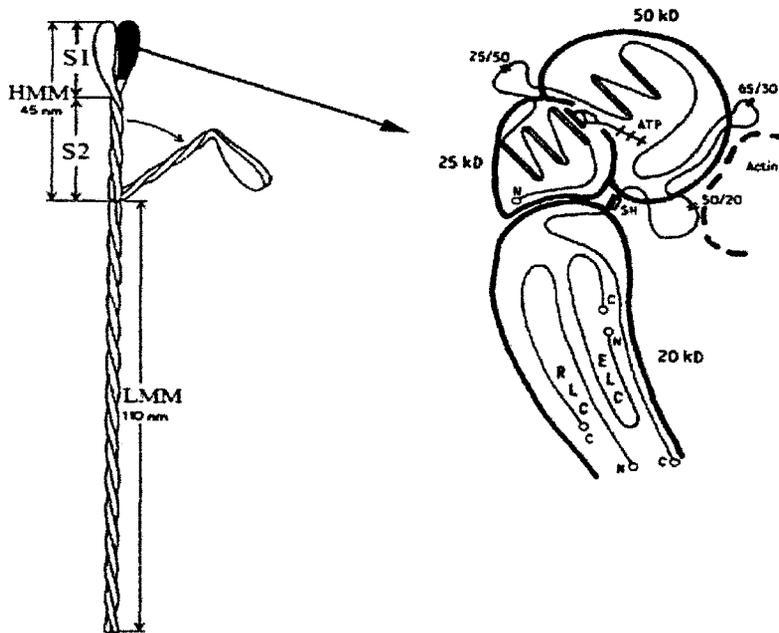


Figure 15 : Structure de la MHC avec ses domaines fonctionnels : LMM et HMM, et détail de la tête S1 et de ses trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa (d'après Vibert & Cohen, 1988). (ELC : essential light chain ; RLC : regulatory light chain).

Les muscles de Mammifères contiennent neuf isoformes sarcomériques de MHC : la MHC-I β /s (s pour slow), la MHC-IIA, la MHC-IIX et la MHC-IIB, ces quatre isoformes étant les MHC prédominantes dans les muscles squelettiques des différentes espèces de Mammifères, la MHC-emb (embryonnaire) et la MHC-neo (néonatal), rencontrées dans les muscles squelettiques au cours du développement, la MHC-eo (extraoculaire) exprimée dans les muscles extraoculaires et du larynx, la MHC- α et la MHC-m exprimées dans les muscles mandibulaires de carnivores tels que le masseter (Schiaffino & Reggiani, 1996).

Dans le muscle rapide, les isoformes MHC-IIA, MHC-IIB et MHC-IIX (ou MHC-IIX/IID) sont coexprimées, tandis que dans le muscle lent, l'isoforme MHC-I β /s est largement prédominante.

Au niveau protéique, les MHC sarcomériques des Mammifères sont fortement

homologues, mais contiennent plusieurs régions divergentes, incluant l'extrémité C-terminale, la région charnière tête-queue, et l' α -hélice de la tête (Moore et coll., 1992). Au niveau de la tête de myosine, il existe deux boucles en surface localisées à proximité des sites de fixation de l'actine et de l'ATP, faiblement conservées, ce qui est important dans l'activité ATPasique et la vitesse de raccourcissement maximale de la molécule de myosine.

3 – Chaînes légères de myosine (MLC : myosin light chain).

Les quatre chaînes légères de myosine sont associées aux têtes de myosine. 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.

MLC1 ou MLC essentielle.

Il existe cinq isoformes de MLC1 décrites dans le muscle strié (Barton & Buckingham, 1985). Les fibres musculaires rapides contiennent deux isoformes, la MLC1-f (MLC1 fast) et la MLC3-f (MLC3 fast), tandis que la MLC1-s (MLC1 slow) est exprimée au niveau des fibres lentes. Il existe également l'isoforme MLC1-emb, exprimée au niveau des muscles en développement. Toutes ces isoformes dérivent de gènes distincts, excepté la MLC1-f et la MLC3-f, dérivant de l'épissage alternatif du même gène (Nabeshima et coll., 1984 ; Periasamy et coll., 1984 ; Robert et coll., 1984). Les séquences en acides aminés de la MLC1-f (de masse moléculaire apparente d'environ 25 kDa) et de la MLC3-f (de masse moléculaire apparente d'environ 17 kDa) sont identiques au niveau des 141 acides aminés C-terminaux, et diffèrent au niveau de l'extrémité N-terminale.

MLC2 ou MLC régulatrice.

Les MLC régulatrices sont également appelées MLC phosphorylables. La contraction du muscle squelettique est activée par le complexe tropomyosine/troponines, et la phosphorylation de la MLC a un rôle modulateur en augmentant la force de contraction à des faibles concentrations en ions calcium (Sweeney et coll., 1993).

Deux isoformes de MLC régulatrices sont décrites dans le muscle squelettique : la MLC2-f (MLC2 fast) au niveau des fibres rapides, et la MLC2-s (MLC2 slow) au niveau des

fibres lentes. Il faut noter l'existence de la MLC2-m, exprimée au niveau des muscles mandibulaires.

B - Les filaments fins.

1 – Structure du filament fin.

Les filaments fins, dont le diamètre varie entre 5 et 7 nm, sont principalement constitués d'actine. Les polypeptides formant les sous-unités d'actine (nommés actine G ou actine globulaire) portent des sites de liaison sur lesquels les têtes de myosine se fixent lors de la contraction. 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.

2 – L'actine.

L'actine monomérique est une protéine globulaire de 43 kDa qui possède quatre sous-domaines. L'actine a la propriété de se polymériser en milieu salin. Les globules d'actine forment alors 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 16).

L'actine F forme le filament fin. Chaque globule d'actine possède un site d'interaction pour les têtes de myosine (Holmes et coll., 1990), interaction moléculaire qui sera à la base de la contraction musculaire (figure 17).

Il existe deux isoformes de l'actine dans les muscles sarcomériques : l' α -actine squelettique et l' α -actine cardiaque, chacun des variants étant codé par un gène distinct. La séquence en acides aminés des deux actines, de masse moléculaire apparente d'environ 41 kDa, est quasiment identique, à l'exception de quatre substitutions seulement sur une séquence de 374 acides aminés (Vandekerckhove et coll., 1986). Dans chacune des classes de Vertébrés, la séquence amino-terminale est Asp-Asp-Glu-Glu pour l' α -actine cardiaque, et Asp-Glu-Asp-Glu pour l' α -actine squelettique ; ces différences sont très importantes, puisque

la partie N-terminale de l'actine est connue comme interagissant avec la myosine (Sutoh, 1982).

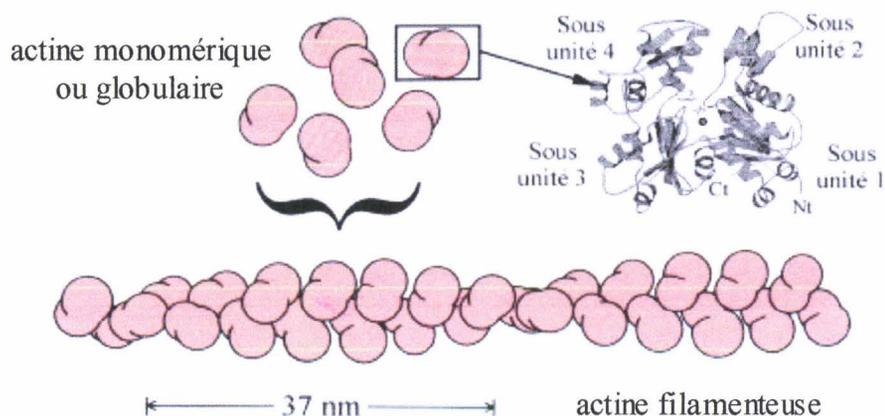


Figure 16 : Arrangement des globules d'actine dans le filament d'actine ; l'assemblage des globules d'actine forme une structure hélicoïdale (d'après Alberts et coll., 1993). L'agrandissement montre la structure d'un globule d'actine constitué de quatre sous-unités.

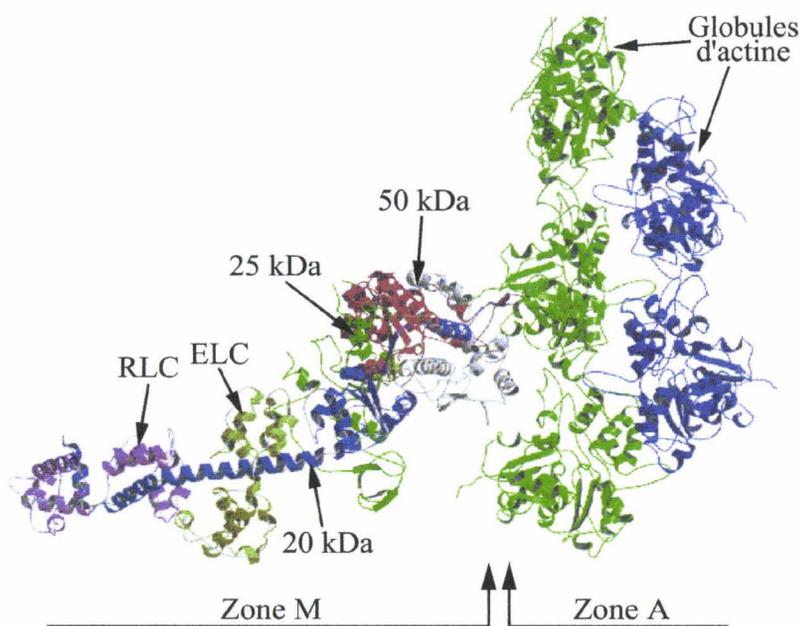


Figure 17 : Assemblage des molécules d'actine (zone A sur le schéma) et de myosine (zone M sur le schéma). Sont également représentées les trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa de la tête S1 de la méromyosine lourde, ainsi que l'interaction avec la MLC essentielle (ELC sur la figure) et la MLC régulatrice (RLC sur la figure).

La distribution de ces deux isoformes varie selon l'espèce et le stade de développement des muscles squelettique et cardiaque. En effet, chez la souris et le rat, les deux isoformes sont

coexprimées durant le développement des muscles squelettique et cardiaque, alors que dans les muscles adultes, ces isoformes sont exprimées spécifiquement dans le muscle squelettique ou le muscle cardiaque (Vandekerckhove, 1986).

3 – La tropomyosine (Tm).

La tropomyosine est une protéine dimérique dont le poids moléculaire est compris entre 65 et 70 kDa (Woods, 1967). Plusieurs dimères s'assemblent par liaison de leurs extrémités N- et C-terminales, avec chevauchement de huit-neuf acides aminés, formant ainsi le long filament de tropomyosine venant se loger dans le sillon délimité par les deux filaments d'actine (Flicker et coll., 1982) (figure 18). La structure cristalline du domaine C-terminal de la tropomyosine montre que cette région ne forme pas une double hélice comme le reste de la molécule : les deux hélices sont séparées et stabilisées par l'association d'une autre molécule de tropomyosine (Li et coll., 2002). Chaque dimère comporte sept séquences répétitives correspondant à des sites d'interaction avec les monomères d'actine (Cummings & Perry, 1973), ce qui stabilise le filament d'actine (Lees-Miller & Helfman, 1991). Les parties intermédiaires sont importantes pour l'activation de l'actine par la myosine (Hitchcock-De Gregori et coll., 2002). L'étude de la structure cristallisée d'un fragment de la région carboxy-terminale de la tropomyosine révèle un site de reconnaissance de la tropomyosine α pour la troponine T (Li et coll., 2002). La partie C-terminale est un site d'accrochage de la troponine T (Hammel & Hitchcock-De Gregori, 1996), qui est la molécule permettant la liaison du complexe des troponines au filament fin (Hinkle et coll., 1999). Dans le muscle strié, la troponine T chevauche et consolide la liaison entre deux tropomyosines (Mayturn et coll., 1999 ; Li et coll., 2002). Le positionnement de la tropomyosine est régulé par le complexe des troponines, présent tous les sept monomères d'actine et composé de trois sous-unités protéiques : la troponine C, la troponine T et la troponine I.

Des études biochimiques ont révélé l'existence de deux isoformes de tropomyosine dans le muscle strié, appelées α et β (Cummins & Perry, 1973), de masse moléculaire apparente d'environ 34 et 36 kDa respectivement et présentant près de 86 % d'homologie de séquence. Ces isoformes s'assemblent en différents types de dimères, de type homodimérique $\alpha\alpha$ et $\beta\beta$, ou de type hétérodimérique $\alpha\beta$, le ratio entre les sous-unités α et β étant 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

coll., 1997). L'hétérogénéité des tropomyosines semble plus importante puisqu'une troisième isoforme, la Tmp3, qui présente de nombreuses homologues avec la Tm α du muscle lent de poulet, a été décrite (Pieples et coll., 2000) ; cette isoforme ne serait exprimée que dans le muscle soleus et serait absente des autres muscles striés. Elle augmenterait les possibilités d'hétérodimères de tropomyosine pouvant être exprimés dans une même cellule.

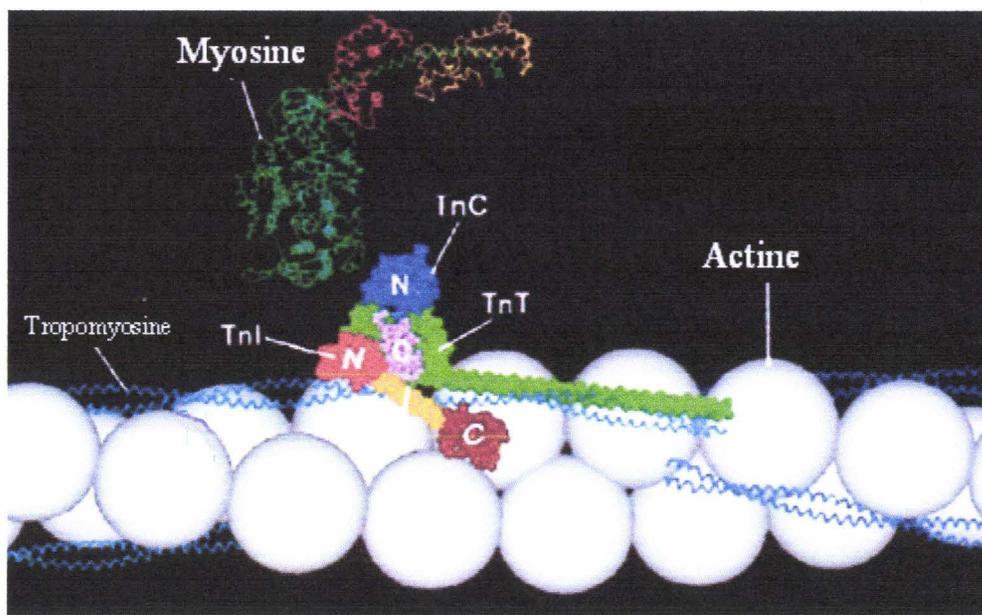


Figure 18 : Représentation schématique de la structure du filament fin, avec notamment le filament de tropomyosine (en bleu), qui s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale d'actine, et le complexe des troponines, avec la troponine C (terminaison N-terminale en bleu et terminaison C-terminale en rose), la troponine I (en rouge, la partie inhibitrice étant en jaune) et la troponine T (en vert). La myosine SI (vert), la chaîne légère essentielle (rouge) et la chaîne légère régulatrice (orange) sont également représentées.

4 – Les troponines (Tn).

Troponine C (TnC).

La troponine C (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. C'est une protéine de masse moléculaire de 18 kDa

tropomyosine (Perry et coll., 1972). La TnI présente également un effet inhibiteur de l'activité ATPasique du complexe actine-S1 (Syska et coll., 1976 ; Levine et coll., 1988). Le fragment 96-115 contient la séquence fondamentale nécessaire à cette inhibition (Talbot & Hodges, 1981) ; le fragment 104-115 ou Ip pour « inhibitory peptide » possède une activité inhibitrice et se lie à l'actine de manière calcium-dépendante (Syska et coll., 1976 ; Talbot & Hodges, 1981). La séquence 135-181 est également impliquée dans l'interaction actine-tropomyosine (Takeda et coll., 1997). La séquence 140-148 correspondrait à un site de liaison au complexe actine-tropomyosine. En l'absence de calcium, la TnI exercerait donc un effet inhibiteur grâce aux séquences 140-148 et 104-115 par liaison au filament d'actine bloquant le complexe tropomyosine-troponines en état de repos. La localisation de la TnI au sein du filament fin est schématisée figures 18 et 20.

Les muscles striés contiennent trois isoformes de TnI : la TnI rapide ou TnI-f (TnI fast), la TnI lente ou TnI-s (TnI slow) et la TnI cardiaque ou TnI-c (Hartner & Pette, 1990). Ces trois isoformes ont un haut degré d'homologie dans leur extrémité C-terminale, tandis que l'extrémité N-terminale est divergente, en particulier entre l'isoforme cardiaque phosphorylable et la troponine I du muscle squelettique.

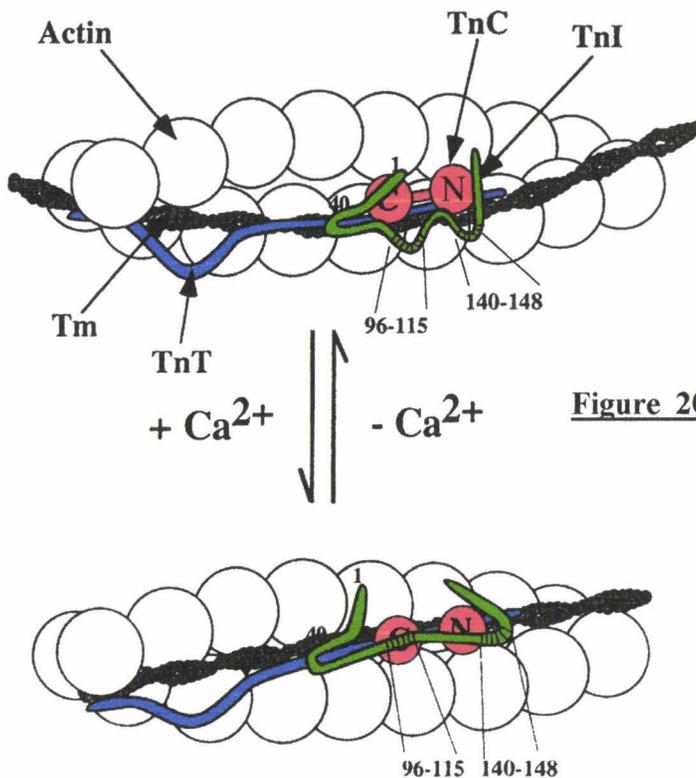


Figure 20 : Localisation de la TnI au sein du filament fin, représentée en vert, en absence et en présence de calcium. La TnI interagit également avec la TnC (en rouge) et avec la TnT (en bleu).

Troponine T (TnT).

La troponine T (TnT) est une protéine asymétrique de 31 à 36 kDa, comportant une

tête globulaire C-terminale et une partie allongée N-terminale. Elle permet la liaison entre le complexe des troponines et la tropomyosine (figure 18).

Il existe deux fragments fondamentaux nécessaires à l'activité fonctionnelle de la protéine. Le fragment T1 (1-158) de la région N-terminale interagit avec la partie C-terminale de la tropomyosine, incluant la partie N-terminale de la molécule de tropomyosine adjointe dans la conformation tête-queue de l'assemblage du filament fin (Pato et coll., 1981 ; White et coll., 1987). La séquence TnT (160-193) se lie au domaine C-terminal de la TnC en présence ou en absence de la séquence inhibitrice primaire de la TnI (Blumenschein et coll., 2001). Le second fragment de la région C-terminale (159-259), noté T2, se lie à la région centrale de la tropomyosine (Morris & Lehrer, 1984 ; Mak & Smilie, 1981) et interagit avec la troponine I, la troponine C et l'actine (Pearlstone & Smillie, 1982 ; Heeley et coll., 1987 ; Perry, 1998).

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 (Schachat et coll., 1987 ; Reiser et coll., 1992). Elle module les interactions TnI-TnC (Cheung et coll., 1987), en réduisant l'affinité de la TnC pour la TnI. La TnT peut augmenter l'activité ATPasique de la myosine en présence de Ca^{2+} (Greaser & Gergely, 1971 ; Farah et coll., 1994 ; Malnic & Reinach, 1994).

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 coll., 1983). La tropomyosine peut propager l'information le long du filament fin et assurer une coopération basique. La présence de la région T1 est indispensable dans la propagation de la coopérativité (Schaertl et coll., 1995). Sa position au niveau de la zone de chevauchement des tropomyosines, région hautement flexible (Phillips et coll., 1986), permet le contrôle de la flexibilité de la tropomyosine (Gordon et coll., 2000).

Il existe trois gènes de la TnT : celui de la TnT-f rapide (Breitbart & Nadal-Ginard, 1986), de la TnT-s lente (Gahlmann et coll., 1987) et de la TnT-c cardiaque (Cooper & Ordahl, 1984), pour lesquels l'épissage alternatif conduit à l'expression de nombreux transcripts chez le rat. L'épissage alternatif du gène de la TnT-f conduit à 64 transcripts (Breitbart et coll., 1985), alors qu'au niveau protéique, quatre isoformes de la TnT-f sont décrites : la TnT-1f, la TnT-2f, la TnT-3f et la TnT-4f (Bastide et coll., 2002). Il existe à ce niveau des variants de phosphorylation (Hartner et coll., 1989). On distingue quatre transcripts de la TnT-s dans le soleus de rat, et quatre variants au niveau protéique (Kischel et coll., 2005).

C - Les autres protéines sarcomériques.

Au niveau du filament fin, la tropomoduline, de masse moléculaire apparente 43 kDa, est une protéine fixant la tropomyosine. Elle coiffe l'extrémité des filaments d'actine afin d'en maintenir la longueur *in vivo*.

Au niveau du filament épais, il existe trois protéines associées à la myosine : la protéine C (masse moléculaire d'environ 140 kDa), la protéine X (masse moléculaire d'environ 145 kDa) et la protéine H (masse moléculaire d'environ 74 kDa). On retrouve également la protéine M (masse moléculaire d'environ 165 kDa) et la myoméline (masse moléculaire d'environ 185 kDa) localisée au niveau de la ligne M.

La titine ou connectine est la plus grande protéine décrite jusqu'à aujourd'hui (masse moléculaire d'environ 3 000 kDa) ; chaque molécule de titine atteint une longueur de 1 μm , allant de la ligne Z jusqu'à la ligne M. Elle permet de positionner les filaments de myosine au centre du sarcomère. C'est la seule protéine connue pour rendre compte des propriétés d'élasticité musculaire (Wand et coll., 1993 ; Labeit & Kolmerer, 1995) La nébuline, protéine géante de masse moléculaire comprise entre 700 et 900 kDa joue également un rôle dans la longueur du filament fin. Enfin, l' α -actinine, de masse moléculaire apparente d'environ 100 kDa, interagit avec les filaments fins au niveau de la ligne Z.

III – Contraction d'une fibre musculaire squelettique.

A – Théorie de la contraction par glissement des filaments.

Lorsqu'une cellule musculaire se contracte, chacun de ses sarcomères raccourcit, et les stries Z successives se rapprochent. Comme la longueur des sarcomères diminue, les myofibrilles raccourcissent elles aussi, de même que l'ensemble de la cellule. Cependant, les filaments ne changent pas de longueur pendant que les sarcomères se contractent.

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.

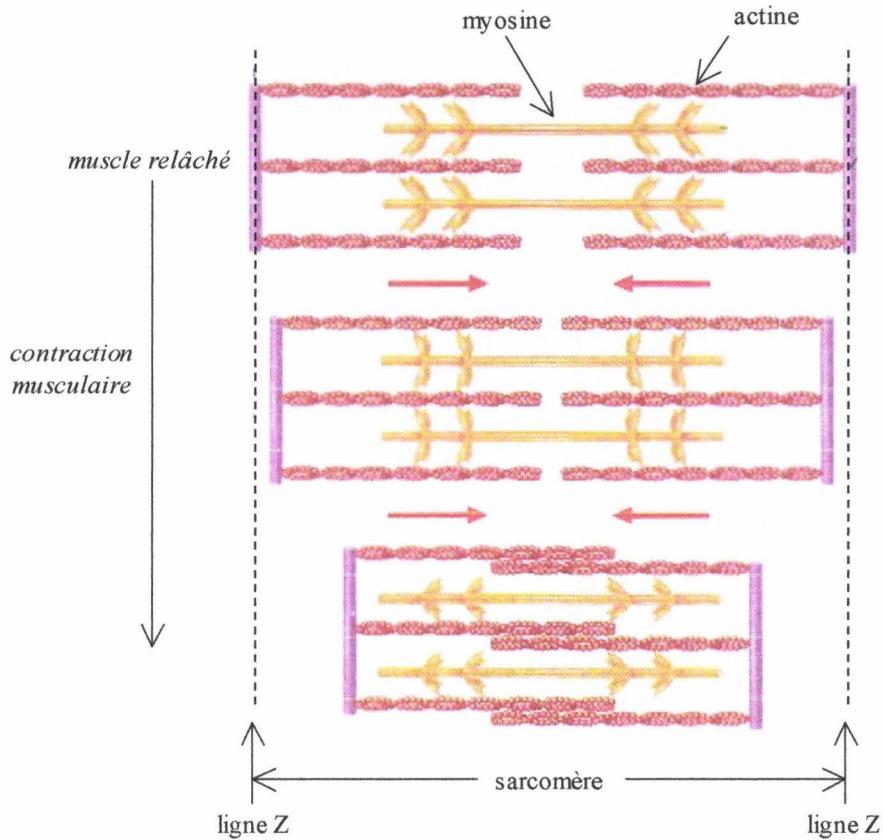


Figure 21 : Théorie de la contraction musculaire par glissement des filaments et raccourcissement du sarcomère.

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 loin dans la région centrale de la bande A (voir figure 13). Ceci aboutit à un raccourcissement de la distance entre les deux stries Z successives. Les bandes I sont également raccourcies, les zones claires disparaissent et les bandes A se rapprochent les unes des autres (figure 21). Mais en aucun cas, la longueur des filaments ne diminue.

B – Mécanisme de la contraction musculaire.

1 – Le cycle ATPasique de la myosine.

La théorie des filaments glissants (Huxley, 1975) est basée sur le coulissement des filaments fins et épais par des interactions cycliques entre l'actine et la myosine. L'énergie nécessaire au basculement de la tête de myosine est fournie par l'activité ATPasique de la

myosine qui libère l'énergie contenue dans la liaison du phosphate inorganique en position gamma.

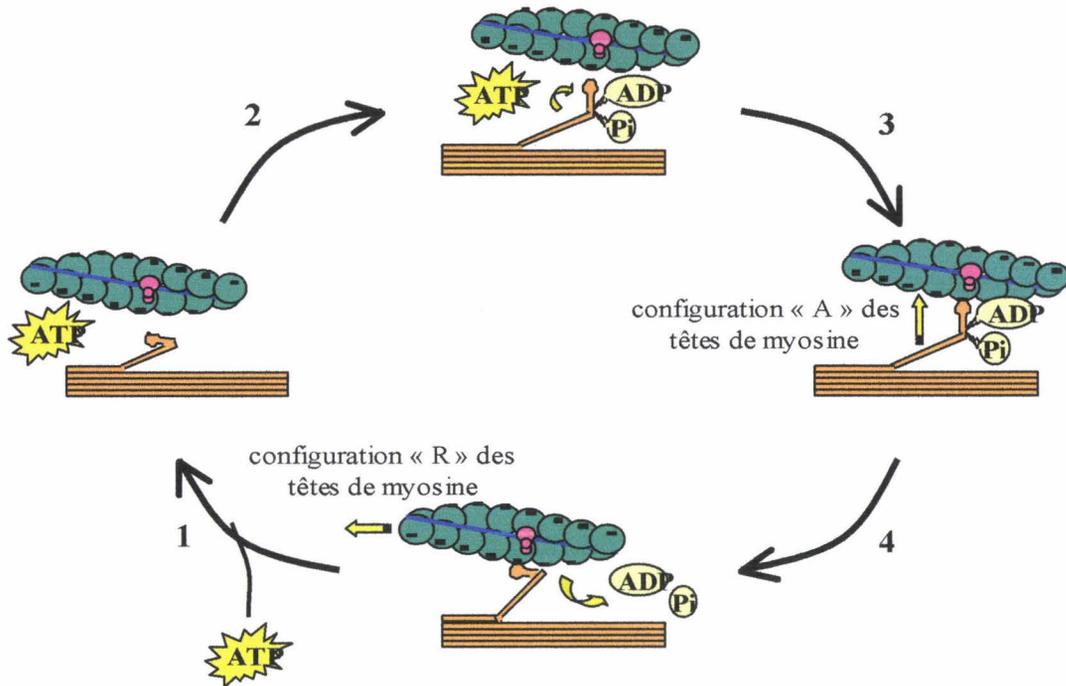
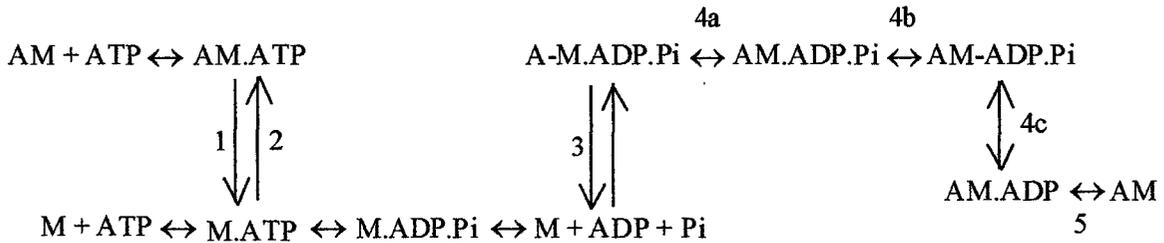


Figure 22 : Séquence d'évènements produisant le glissement du filament épais sur le filament fin lors de la contraction musculaire : le cycle ATPasique de la myosine.

Le cycle attachement-détachement de la myosine (M) sur l'actine (A) comprend plusieurs étapes (figure 22) :

- (1) la liaison de l'ATP sur la tête de myosine induit une dissociation du complexe actine-myosine ($AM \leftrightarrow A + M.ATP$) ;
- (2) le clivage de l'ATP permet à la myosine de revenir à un angle de 90° ($M.ATP \leftrightarrow M.ADP.P_i$) ;
- (3) le complexe $M.ADP.P_i$ s'associe à l'actine par une liaison de faible affinité ($A + M.ADP.P_i \leftrightarrow A-M.ADP.P_i$) ;
- (4) le complexe actine-myosine ($M.ADP.P_i$) subit une isomérisation et l'interaction actine-myosine devient très forte ($A-M.ADP.P_i \leftrightarrow AM.ADP.P_i$). Le phosphate inorganique est libéré et le pont passe dans la configuration R ($AM.ADP.P_i \leftrightarrow AM.ADP + P_i$), générant la force par coulissement des myofilaments (Pate & Cooke, 1989 ; Rayment & Holden, 1994 ; Holmes, 1996).

L'ensemble de ces étapes est récapitulé par le schéma de Gordon et coll. (Gordon et coll., 2000).



Des étapes intermédiaires sont suggérées à travers d'autres travaux (Kawai et coll., 1987 ; Millar & Homsher, 1992 ; Geeves & Conibear, 1995) :

- 4a - isomérisation $\text{A-M}.\text{ADP}.\text{P}_i \leftrightarrow \text{AM}.\text{ADP}.\text{P}_i$ régulée par le taux de calcium environnant (Ma & Taylor, 1994) ;
- 4b - production de force
- 4c - libération du P_i stabilisant la conformation génératrice de force (Dantzig et coll., 1992).
- 5 - isomérisation du complexe $\text{AM}.\text{ADP}$ et libération de l'ADP.

2 – Régulation calcique de la contraction musculaire.

Le calcium va jouer 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 (étape 1 figure 23) ; le complexe tropomyosine/troponines masque le site de fixation de la myosine à l'actine *via* la troponine I.

La fixation d'ions calcium au niveau de la troponine C (étape 2 figure 23) renforce la liaison entre les trois sous-unités de troponines et initie le déplacement du filament de tropomyosine par l'intermédiaire de la troponine T (étape 3 figure 23), conduisant à l'exposition des sites de fixation de la myosine sur l'actine. De plus, le complexe TnC-Ca^{2+} déplace la TnI de sa position inhibitrice sur l'actine (étape 3 figure 23) en diminuant l'affinité de la troponine I pour l'actine. Ainsi, la fixation de la tête de myosine sur l'actine peut se faire pleinement (étape 4 figure 23), 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.

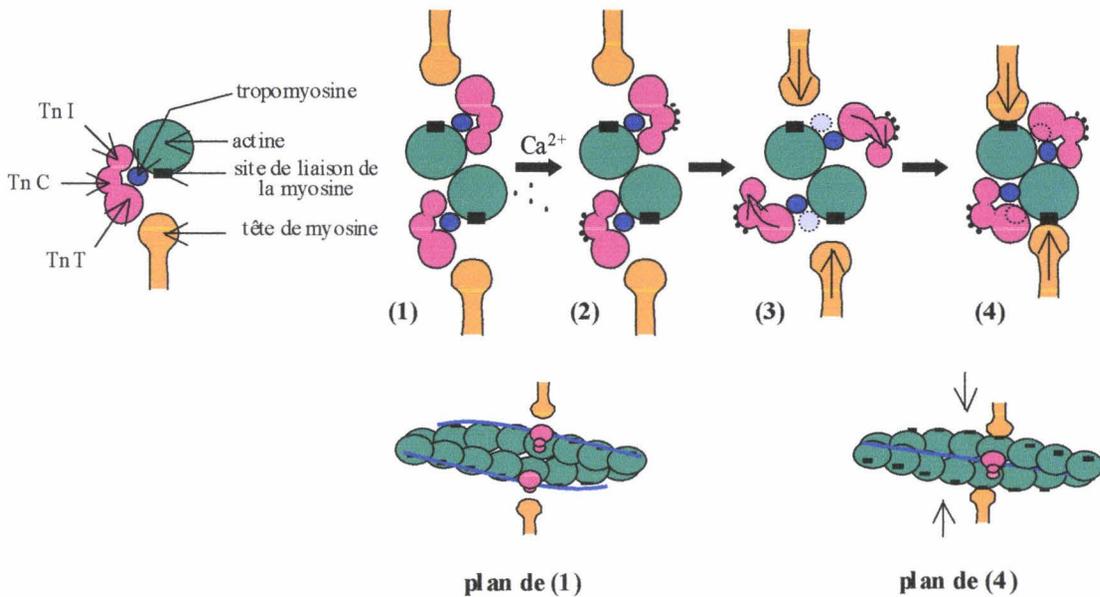


Figure 23 : Mécanisme de la régulation calcique de la contraction musculaire. Les différentes étapes numérotées de 1 à 4 correspondent aux mêmes étapes que celles décrites figure 22.

C – Le couplage excitation-contraction.

Il s'agit de la succession d'évènements par lesquels le potentiel d'action transmis le long du sarcolemme provoque le glissement des myofilaments. Le potentiel d'action est très court et prend fin bien avant que le moindre signe de contraction ne se manifeste. Le laps de temps s'écoulant entre le début du potentiel d'action et le début de l'activité musculaire est appelé temps de latence ; les évènements constituant le couplage excitation-contraction se produisent durant cet intervalle.

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 de la sous-unité α 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 (figure 24).

Les évènements majeurs du cycle excitation-contraction-relaxation comprennent :

- (1) l'initiation et la propagation d'un potentiel d'action le long de la membrane plasmique et du système tubule transverse ;
- (2) la transmission de la dépolarisation du système tubule transverse à la membrane du réticulum sarcoplasmique ;
- (3) la libération des ions calcium (Ca^{2+}) stockés dans le réticulum sarcoplasmique via le récepteur à la ryanodine ;
- (4) l'augmentation transitoire de la concentration en calcium myoplasmique ;
- (5) la détection de cette élévation de calcium par une protéine « calcium-sensor » : la troponine C (TnC) ;
- (6) l'activation du système régulateur de l'appareil contractile entraînant la formation de ponts actine-myosine ;
- (7) la dissociation du Ca^{2+} de la TnC ;
- (8) le recaptage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique grâce à l'action de la pompe calcique ATPasique du réticulum sarcoplasmique (SERCA).

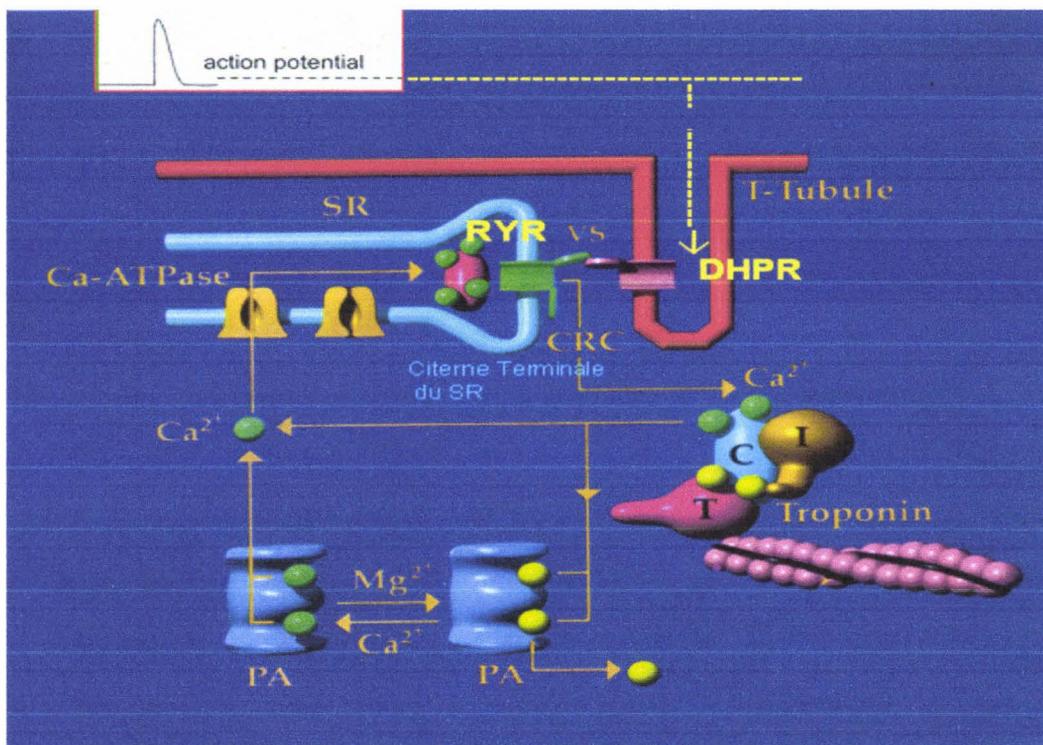


Figure 24 : Représentation schématique des différents acteurs protéiques intervenant dans le cycle excitation-contraction-relaxation.

Les interactions entre le récepteur aux dihydropyridines (DHPR), localisé dans la membrane du système tubule transverse, et le RyR sont 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 qui va informer le RyR de l'existence d'une dépolarisation de la membrane tubulaire.

V – Le métabolisme énergétique du muscle squelettique.

La contraction musculaire nécessite une quantité importante d'ATP afin de permettre le glissement des myofilaments (formation des ponts acto-myosine) dépendant de la myosine ATPase, ainsi que pour activer les pompes à calcium et les sodium/potassium ATPases. Pourtant, les quantités d'ATP emmagasinées dans les muscles ne sont pas très importantes, et une contraction donnée ne tarde pas à épuiser ces réserves d'ATP. Celui-ci doit donc être régénéré de façon continue afin que la contraction puisse se poursuivre.

Pendant l'activité musculaire, la régénération de l'ATP se fait selon trois systèmes : le système ATP/créatine phosphate, le système glycolytique et le système oxydatif (figure 25). Ces voies de régénération de l'ATP sont utilisées différemment au cours du temps selon la durée de l'exercice musculaire.

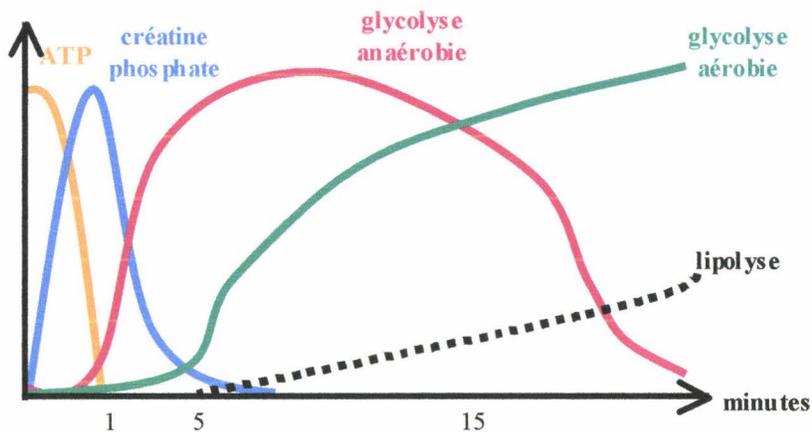


Figure 25 : Sources d'énergie du muscle squelettique lors du travail musculaire selon la durée de l'exercice exprimée en minutes.

Par ailleurs, le pourcentage de la dépense énergétique totale couvert par chacun des métabolismes est variable selon l'activité sportive considérée (figure 26). Ainsi, lors d'un exercice intense de courte durée (par exemple l'haltérophilie), c'est le métabolisme anaérobie alactique qui sera prédominant, alors qu'un exercice musculaire de longue durée (par exemple lors d'un marathon) nécessitera la voie aérobie.

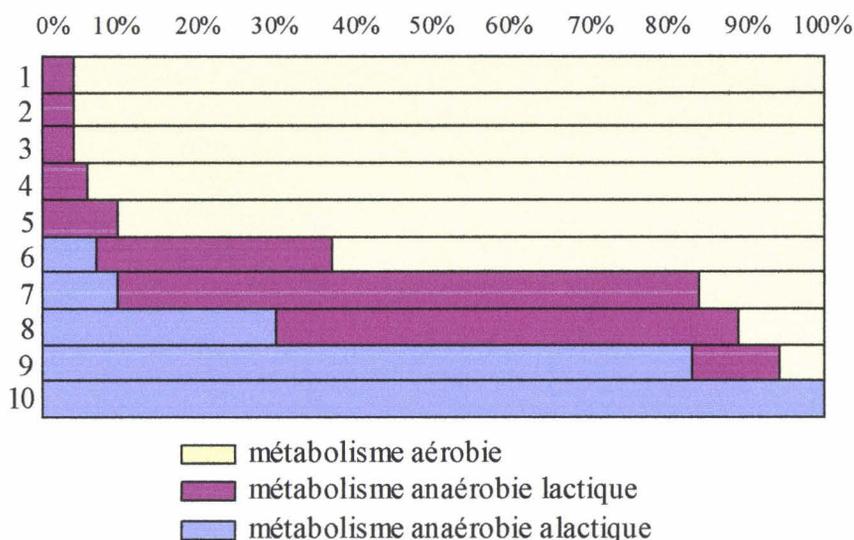


Figure 26 : *Pourcentage de la dépense énergétique totale couvert par chacun des métabolismes selon l'activité sportive. (1) ski de fond ; (2) marathon ; (3) marche ; (4) nage libre (1 500 m) ; (5) course (3 000 m) ; (6) course (1 500 m) ; (7) nage libre (200 m) ; (8) course (400 m) ; (9) course (100 m) ; (10) haltérophilie.*

A – Régénération rapide de l'ATP.

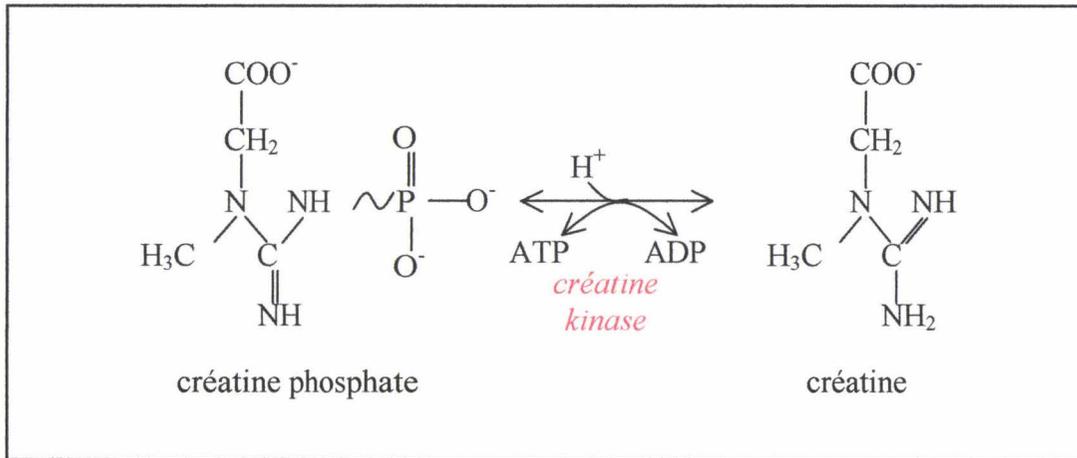
1 – Créatine kinase.

Au début d'une activité musculaire intense, l'ATP emmagasiné dans les muscles est consommé en environ six secondes (en orange sur la figure 25). La forte demande en ATP que nécessite la poursuite de l'activité musculaire provient d'une réaction couplée de l'ADP et de la créatine phosphate, un composé riche en énergie abondamment retrouvé dans le muscle. Son énergie lui vient de l'ATP mitochondrial, et son hydrolyse permet de régénérer la charge énergétique de l'ATP cytoplasmique.

Sous le contrôle de la créatine kinase, cette réaction rapide, ne nécessitant pas d'oxygène, permet le transfert d'un groupement phosphate de la créatine phosphate sur la molécule d'ADP, permettant alors la formation d'une molécule d'ATP (en bleu sur la figure 25). Ce système fournit assez d'énergie pour un exercice de 20 secondes à 2 minutes ; cette réaction fournit donc rapidement de l'ATP, permettant au muscle de préparer les voies

anaérobies et aérobie devant être activées pour répondre à l'augmentation rapide de la demande en ATP.

Ensemble, l'ATP et la créatine phosphate présents dans le muscle permettent de maintenir une puissance musculaire maximale pendant 10 à 15 secondes (suffisante pour courir un sprint de 100 m par exemple). La réaction couplée est réversible, et les réserves de créatine phosphate sont reconstituées pendant les périodes d'inactivité.



La créatine kinase catalyse l'hydrolyse de la liaison riche en énergie de la créatine phosphate, et synthétise un ATP en transférant directement l'énergie libérée (44 kJ/mol) et le phosphate sur l'ADP. La réaction, schématisée ci-dessus, est réversible, de sorte que lorsque le muscle est riche en ATP, l'énergie est récupérée pour faire de la phosphocréatine. Au contraire, lorsque l'ATP redevient nécessaire, ce transfert direct restitue l'énergie mise en réserve.

La créatine kinase existe sous deux formes fonctionnelles dans les muscles (figure 27) : une forme dimère dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire de la mitochondrie, qui peut se polymériser en octamère au contact de la membrane interne des mitochondries. La forme octamère se lie sur la face externe de la membrane interne au niveau de l'ATP/ADP translocase (qui permet la sortie des molécules d'ATP hors de la mitochondrie). Cette forme octamérique hydrolyse aussitôt les liaisons riches en énergie de l'ATP et leur phosphate pour les transférer sur la créatine, tandis que l'ADP repart vers la matrice mitochondriale.

Cette canalisation de l'ATP vers la créatine kinase octamérique accélère donc le transfert d'énergie vers la créatine. La créatine phosphate diffuse à travers la membrane externe de la mitochondrie. Dans le cytoplasme, la forme dimérique utilise la créatine phosphate pour régénérer l'ATP cytoplasmique qui sera utilisé par la myosine pour la

contraction musculaire. L'ensemble de ce mécanisme correspond à la navette de la créatine kinase.

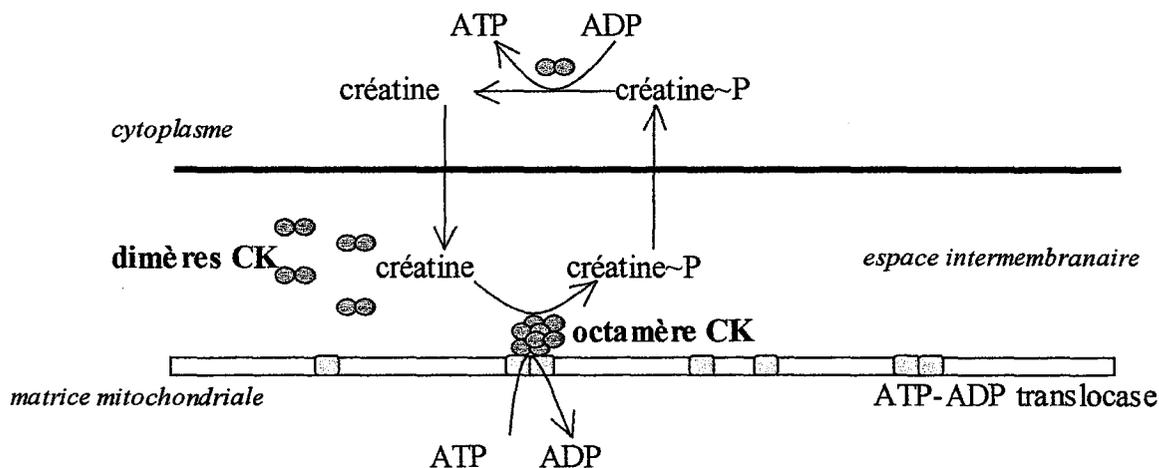


Figure 27 : Navette de la créatine kinase.

Les cellules musculaires expriment trois isoformes de la créatine kinase (CK) : l'isoforme M, l'isoforme B, et une isoforme mitochondriale. Les sous-unités M et B s'associent en dimère, pour former les isoenzymes MM, MB et BB. Par ailleurs, les isoformes de la créatine kinase sont compartimentées ; une partie est soluble dans le cytoplasme, tandis qu'une part importante de la MM-CK est fixée à des structures intracellulaires, à proximité des sites d'utilisation de l'ATP. L'isoforme MM est ainsi retrouvée au niveau de la bande M de la myofibrille (Turner et coll., 1973 ; Walliman et coll., 1977), au réticulum sarcoplasmique (Baskin & Deamer, 1970) et au sarcolemme (Jockers-Wretou et coll., 1977 ; Sharov et coll., 1977).

La distribution des isoformes de créatine kinase dépend également du type de métabolisme. Ainsi, dans les muscles lents, il y a une proportion plus importante de créatine kinase mitochondriale (Wyss et coll., 1992) et une faible proportion des sous-unités cytosoliques (Yamashita & Yoshioka, 1991). Dans les muscles rapides, on retrouve au contraire une part plus importante de créatine kinase cytosolique que de créatine kinase mitochondriale.

2 – Adénylate kinase (AK) ou myokinase.

Les adénylate kinases sont des enzymes conservées au cours de l'Evolution ; elles catalysent la réaction suivante :



Cette réaction est une étape clé dans le métabolisme de l'adénine et dans le transfert des groupements phosphoryl de haute énergie (~P) au niveau du réseau énergétique de la cellule. Il existe de nombreuses isoformes d'adénylate kinase, AK1 étant la forme cytosolique majeure dans le muscle squelettique (Tanabe et coll., 1993).

Il a également été démontré une interaction entre l'adénylate kinase et des enzymes glycolytiques, en particulier avec la phosphofructokinase (Gerlach & Hofer, 1986). Enfin, il faut également noter l'implication de l'adénylate kinase dans la communication entre les ATPases myofibrillaires et la mitochondrie (Savabi, 1994 ; Dzeja & Terzic, 1998), ce qui permet le maintien d'un flux énergétique continu. La translocation de l'ADP vers la mitochondrie ou le relargage de l'ATP dans le cytosol est réalisé *via* un complexe constitué de l'adénosine nucléotide translocase, la porine VDAC (VDAC : voltage anion-selective channel protein) et la créatine kinase octamérique. Lorsque le gastrocnemius est déplété en adénylate kinase, la diffusion de l'ADP est fortement limitée, et on observe une augmentation concomitante de l'adénosine nucléotide translocase et de la créatine kinase mitochondriale (Janssen et coll., 2003). Les auteurs suggèrent qu'une modification post-traductionnelle puisse être à l'origine de cette régulation se mettant en place en cas d'absence de l'adénylate kinase.

B – Le système glycolytique.

Bien que la concentration en créatine phosphate du muscle soit quatre fois plus importante que celle de l'ATP, cette source d'énergie n'est cependant pas suffisante pour fournir la quantité d'ATP requise au maintien de la contraction musculaire. Afin de fournir un supplément d'ATP, la cellule musculaire en activité va utiliser la glycolyse comme voie métabolique de dégradation du glucose, ce qui conduit à la production d'ATP et d'acide pyruvique. La glycolyse se produit en état d'anaérobie, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas la présence d'oxygène. Le devenir du produit final de la glycolyse dépend cependant de la présence ou non d'oxygène.

En l'absence d'oxygène, l'acide pyruvique sera transformé en acide lactique par la lactate déshydrogénase, alors qu'en situation aérobie, le pyruvate pourra être oxydé par le

cycle de Krebs au niveau de la mitochondrie. Bien que l'hydrolyse de la créatine phosphate et la glycolyse produisent moins d'ATP par molécule de glucose que la voie aérobie, leur utilisation permet de synthétiser l'ATP plus rapidement. Par conséquent, ces voies constituent les principales sources d'énergie lors de la phase initiale d'un exercice musculaire de grande intensité (en rose sur la figure 25).

1 – La glycolyse.

La glycolyse est une chaîne métabolique permettant à une cellule de produire de l'énergie à partir du glucose. Cette chaîne est d'une importance fondamentale en biologie, et elle est partagée par tous les êtres vivants. La glycolyse est d'une efficacité incroyable en raison de son optimisation qui la conduit à une vitesse extrême en peu de temps, pouvant produire bien plus d'énergie par unité de temps que toute autre voie métabolique. Ainsi, c'est elle qui alimente la contraction musculaire en cas d'effort intense.

Dans les cellules, la totalité de cette voie s'effectue dans le cytoplasme (Rawn, 1989 ; Weil, 1995). La première étape de la glycolyse est la phosphorylation du glucose, immédiatement après son entrée dans la cellule, en glucose-6-phosphate par action de l'hexokinase ; le but principal de cette étape est d'empêcher le glucose de ressortir de la cellule. Ensuite, par l'intermédiaire d'une phosphoglucoisomérase puis d'une phosphofructokinase, le glucose-6-phosphate est converti en fructose-6-phosphate puis en fructose-1,6-diphosphate. Sous l'action d'une aldolase, le fructose-1,6-diphosphate est clivé en deux trioses phosphate : le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone phosphate. Seul le glycéraldéhyde-3-phosphate subit la suite des réactions ; le dihydroxyacétone phosphate sera converti en glycéraldéhyde-3-phosphate par action de la triose phosphate isomérase. L'oxydation de glycéraldéhyde-3-phosphate en présence de NAD^+ et de phosphate va conduire au 1,3-diphosphoglycérate sous l'action de la glycéraldéhyde-3-phosphate isomérase. Cette réaction exergonique va produire un NADH et un triose biphosphaté. Une première déphosphorylation est réalisée par la phosphoglycérate kinase pour produire du 3-phosphoglycérate, et la réaction s'accompagne de la formation d'une molécule d'ATP. Une isomérisation par une phosphoglycérate mutase puis une déshydratation par une énoïase va donner successivement du 2-phosphoglycérate puis du phosphoénoïpyruvate. Une seconde déphosphorylation par la pyruvate kinase va permettre de récupérer l'énergie du phosphate sous forme d'ATP, et d'aboutir au produit final de la glycolyse : le pyruvate. L'ensemble de

ces réactions est décrit figure 28.

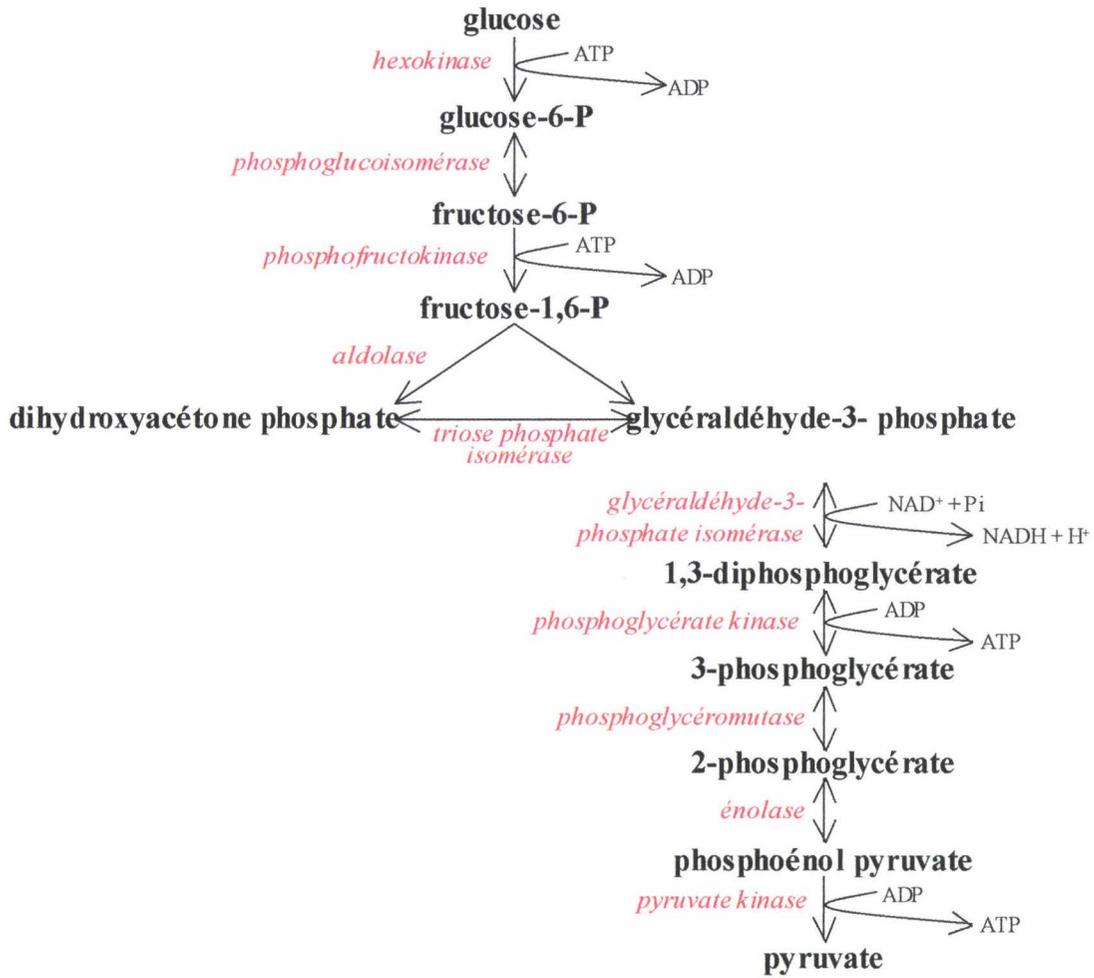
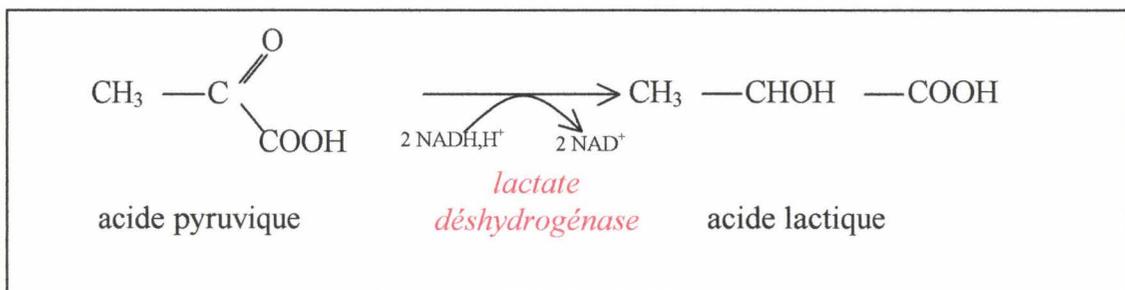


Figure 28 : Schéma récapitulatif des réactions de la glycolyse.

2 – Fermentation lactique.

La fermentation lactique, dont la réaction est schématisée ci-dessous, utilise le produit final de la glycolyse, le pyruvate, pour former l'acide lactique sous l'action de la lactate déshydrogénase.



Cette fermentation lactique se produit dans les cellules musculaires soumises à un effort intense, mais l'un des inconvénients majeurs de cette voie est la formation de l'acide lactique, toxique pour la cellule, et responsable de la fatigue musculaire.

C – Le système oxydatif.

La production oxydative de l'ATP se déroule dans les mitochondries, et requiert donc la présence d'oxygène. Ce système possède un rendement énergétique énorme, et intervient lorsque la contraction musculaire devient plus soutenue (en vert sur la figure 25).

Le glucose emprunte d'abord la voie de la glycolyse, et le pyruvate formé est converti en acétyl-CoA dans les mitochondries. Ce dernier est ensuite soumis à une suite complexe de réactions chimiques *via* le cycle de Krebs, menant à la synthèse de dix-huit moles d'ATP par mole de glucose, ainsi que du carbone et de l'hydrogène. En se liant à l'oxygène, le carbone libéré se transforme en dioxyde de carbone, pour être ensuite rejeté par les poumons *via* la circulation sanguine. Pour sa part, l'hydrogène s'élimine en empruntant la chaîne de transport des électrons, ce qui prévient l'acidification du milieu cellulaire. Les métabolismes glycolytique et oxydatif du glucose constituent un processus essentiel au maintien d'une activité physique pour laquelle la demande énergétique est accrue.

1 – Description du cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs, encore appelé cycle des acides tricarboxyliques en raison des deux premiers substrats de la chaîne (le citrate et l'isocitrate sont des acides portant trois groupements $-COOH$) prend la suite de la glycolyse anaérobie en présence d'oxygène (Rawn, 1989 ; Weil, 1995). L'ensemble du cycle, qui se déroule dans la matrice mitochondriale, est schématisé figure 29. Le pyruvate, produit final de la glycolyse dans le cytoplasme, pénètre dans la mitochondrie, les deux membranes lui étant perméables. La première étape consiste à convertir le pyruvate en acétylcoenzyme A (acétylCoA) par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase. C'est cette molécule d'acétylCoA qui va entrer dans le cycle de Krebs. Dans un premier temps, l'acétylCoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate grâce à la citrate synthase. L'énergie nécessaire à cette réaction est fournie par le clivage de la liaison avec le coenzyme A. Le citrate va ensuite être transformé en isocitrate par l'aconitase ; ce dernier va être décarboxylé puis oxydé pour donner l' α -cétoglutarate avec réduction d'un

NAD^+ en NADH, H^+ . Il va à son tour subir une décarboxylation dont l'énergie va servir à réduire un autre NAD^+ et greffer un coenzyme A à la molécule pour produire le succinylCoA, par action de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. La libération du coenzyme A produisant le succinate va dégager de l'énergie, permettant de produire une molécule d'ATP à partir d'un ADP et d'un phosphate inorganique. Le succinate va alors subir une déshydrogénation par la succinate déshydrogénase conduisant au fumarate, les deux hydrogènes étant récupérés par le FAD pour former le FADH_2 ; cette enzyme, qui fait partie de la chaîne respiratoire, présente la particularité d'être intégrée dans la membrane interne de la mitochondrie. Le fumarate va être hydraté en malate par la fumarate déshydrogénase, puis oxydé en oxaloacétate avec réduction d'un autre NAD^+ par la malate déshydrogénase. L'oxaloacétate, substrat de départ, est ainsi régénéré pour débiter un autre cycle.

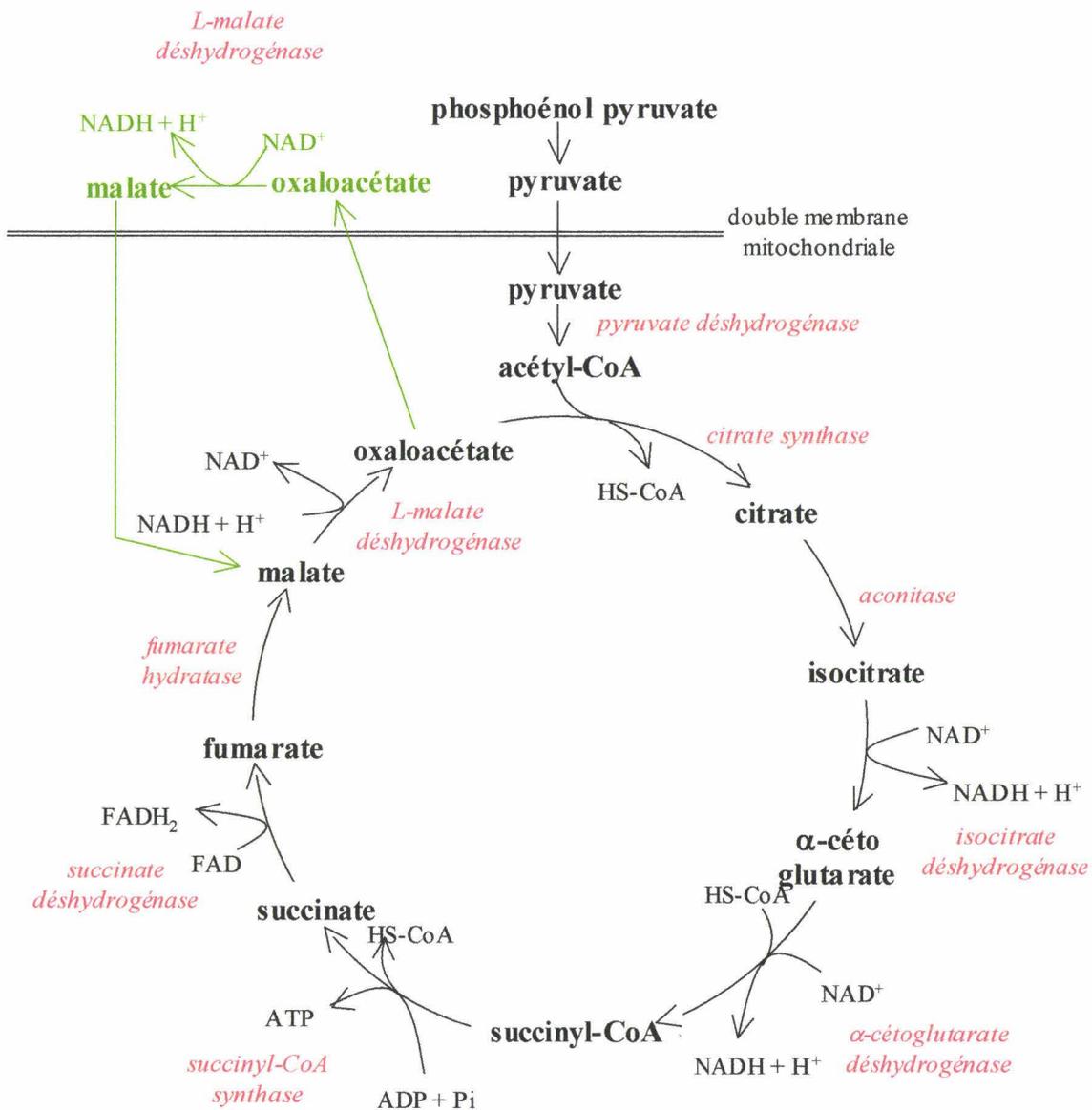
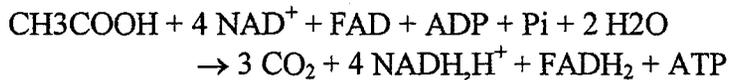


Figure 29 : Schéma récapitulatif du cycle de Krebs.

Le bilan global du cycle est donc :



2 - Entretien du cycle.

Le cycle de Krebs est à l'intersection de nombreuses voies métaboliques ; ainsi, les différents « réactifs » peuvent être soustraits du cycle, ce qui pourrait donc empêcher sa régénération. Pour y remédier, il existe des voies métaboliques (en vert sur la figure 29) permettant de produire de l'oxaloacétate et du malate à partir du phosphoénolpyruvate, ces deux produits pouvant ensuite traverser la double membrane mitochondriale pour relancer le cycle. Cette « navette » malate-oxaloacétate est possible du fait de l'existence de la L-malate déshydrogénase, présente sous deux formes : l'une cytosolique (permettant la réaction oxaloacétate → malate), et la seconde mitochondriale (permettant la réaction malate → oxaloacétate).

3 - Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP.

A chaque tour du cycle de Krebs, quelques ATP sont produits, mais la plus grande part de l'énergie est stockée sous forme de molécules réduites (NADH, H⁺ et FADH₂). Les électrons, apportés par les cofacteurs réduits, sont captés par les chaînes de transport des électrons de la membrane mitochondriale, pour atteindre finalement l'oxygène afin de former une molécule d'eau. Les cofacteurs oxydés (NAD⁺ et FAD) sont alors réutilisés au niveau des voies métaboliques.

Le passage des électrons dans la chaîne de transport des électrons libère une quantité importante d'énergie. Cette libération d'énergie n'est pas directement couplée à la production d'ATP. Cette énergie est utilisée pour la mise en place d'un gradient électrochimique grâce à un couplage chimio-osmotique ; il y a conversion de l'énergie chimique en énergie osmotique. Le couplage est réalisé par l'ATP synthase, qui crée un canal spécifique aux protons. Le mécanisme moléculaire du couplage reste encore à élucider, mais il semblerait que le protomère β de la sous-unité F1 de l'ATP synthase existe sous différentes formes, et

que le passage d'une forme à l'autre soit réalisé par le flux de protons, une des formes du protomère β créant un environnement favorable pour la synthèse de l'ATP.

D – Origine du glucose : le glycogène.

Le glucose est une source d'énergie fondamentale pour les cellules ; en particulier, les muscles squelettiques, en contraction rapide, ont besoin d'un approvisionnement important en glucose qui, par l'intermédiaire de la glycolyse, fournit l'énergie requise.

Le glycogène, dont la masse moléculaire peut atteindre 500 000 daltons, est un homopolysaccharide constitué d'un enchaînement de molécules de glucose liées en α -1,4, ramifié par d'autres chaînes de glucose en liaison α -1,6. L'organisme des animaux a développé dans les muscles striés un processus de mobilisation rapide en réponse à une demande énergétique immédiate. Ce processus est la glycogénolyse (dégradation du glycogène) (figure 30). Les réserves en glycogène des muscles peuvent être reconstituées après une activité qui en a consommé une partie. Le glycogène est synthétisé à partir du glucose-6-phosphate comme précurseur ; la synthèse du glycogène est la glycogénogénèse (figure 31).

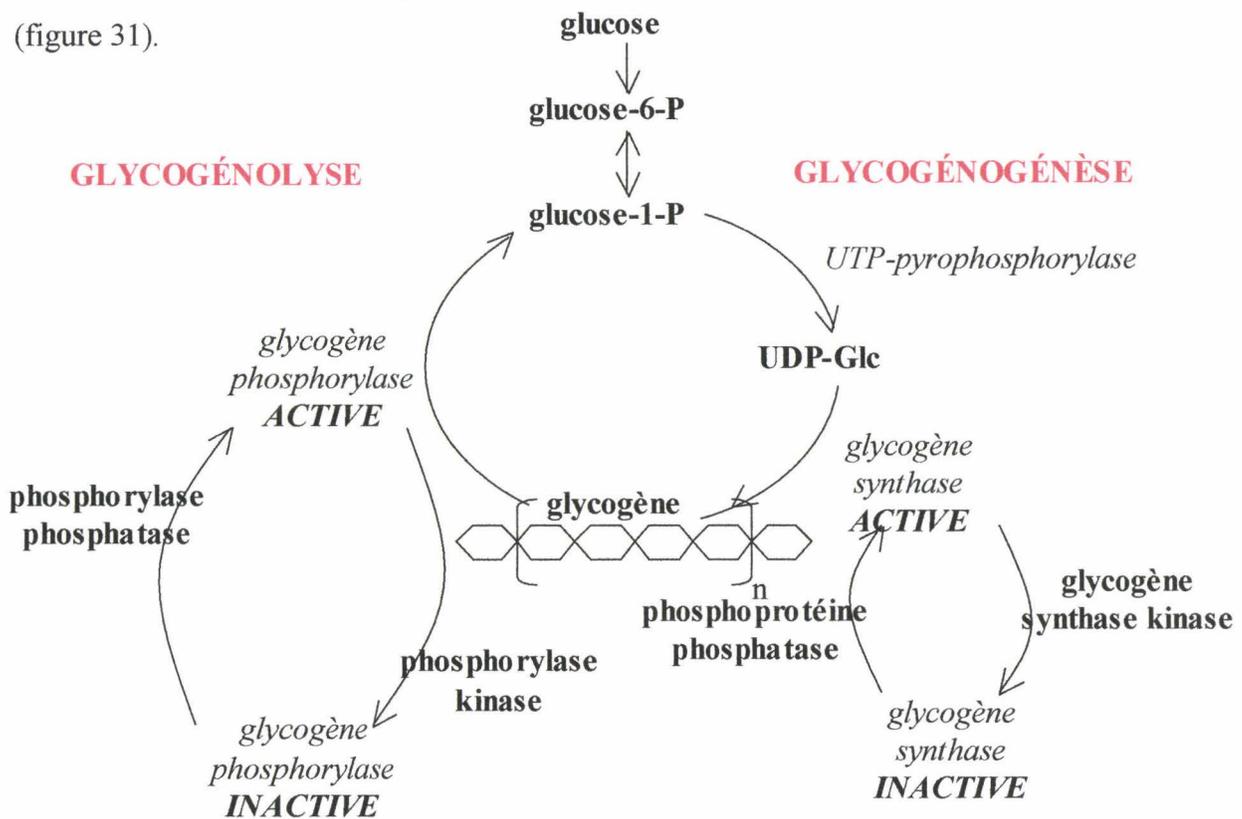


Figure 30 : Schéma récapitulatif du métabolisme du glycogène.

VI – Polymorphisme des fibres musculaires squelettiques.

A – Fibres lentes et fibres rapides.

Des études histologiques du muscle squelettique ont révélé l'existence de deux types majeurs de fibres : les fibres à contraction lente ou fibres de type I, et les fibres à contraction rapide ou fibres de type II (figure 31).

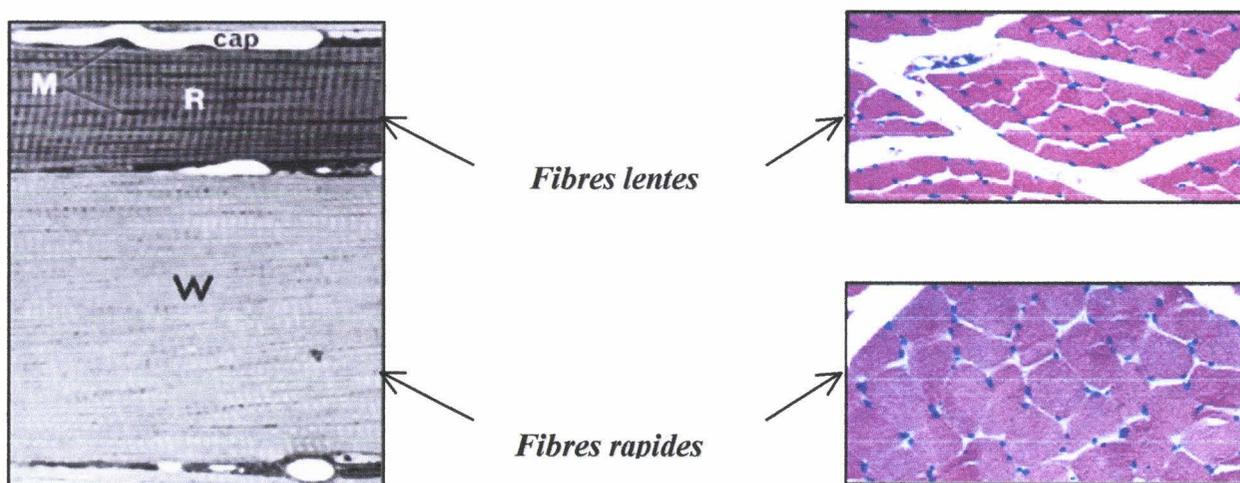


Figure 31 : Coupes histologiques d'un muscle squelettique permettant de mettre en évidence les deux types de fibres musculaires, lentes et rapides.

Les fibres de type I sont habituellement de petite taille, et présentent une activité myosine ATPase lente associée à une cinétique de contraction lente, d'où leur nom de fibres lentes. La présence d'une forte vascularisation ainsi que l'abondance en myoglobine leur confèrent une coloration rouge caractéristique. Elles possèdent de nombreuses mitochondries, et les enzymes impliquées dans la voie de synthèse aérobie de l'ATP sont très actives. Toutes ces caractéristiques démontrent la prédominance du métabolisme oxydatif de ces fibres, leur assurant une grande résistance à la fatigue, ce qui leur permet de maintenir un exercice modéré de longue durée lorsque l'apport en oxygène est suffisant.

Au contraire, les fibres musculaires de type II, à contraction rapide, et plus particulièrement les fibres de type IIB, sont généralement de diamètre important, peu vascularisées et donc pauvres en myoglobine, d'où leur couleur blanche. Pauvres en mitochondries, elles utilisent principalement les voies de dégradation anaérobie pour la synthèse de l'ATP, ce qui conduit à la formation d'acide lactique. Bien qu'elles possèdent une

réserve importante de glycogène, la dégradation rapide de celui-ci ainsi que l'accumulation subséquente d'acide lactique les prédisposent à la fatigue. Ces propriétés confèrent donc aux fibres rapides de type II la capacité de se contracter de manière intense pour une courte durée.

Tableau IV : Caractéristiques fonctionnelles, métaboliques et structurales des fibres lentes et des fibres rapides.

	Fibres de type I	Fibres de type IIA	Fibres de type IIB
<u>Caractéristiques structurales</u>			
<i>Diamètre de la fibre</i>	faible	intermédiaire	élevé
<i>Nombre de mitochondries</i>	élevé	élevé	faible
<i>Dimension du réticulum sarcoplasmique</i>	faible	élevée	élevée
<i>Vascularisation</i>	importante	importante	faible
<i>Couleur</i>	rouge	rouge/rose	blanche
<u>Caractéristiques fonctionnelles</u>			
<i>Vitesse de contraction</i>	lente	rapide	rapide
<i>Force de contraction</i>	faible	élevée	élevée
<i>Résistance à la fatigue</i>	élevée	intermédiaire	faible
<u>Caractéristiques métaboliques</u>			
<i>Pouvoir oxydatif</i>	élevé	faible	faible
<i>Activité glycolytique</i>	faible	élevée	élevée
<i>Réserve de glycogène</i>	faible	élevée	élevée
<i>Contenu en myoglobine</i>	élevée	élevée	faible
<i>Métabolisme prédominant</i>	oxydatif/ aérobie	mixte	glycolytique/ anaérobie
<i>Réserve en triglycérides</i>	élevée	mixte	faible

Les fibres musculaires de type IIA possèdent des caractéristiques métaboliques et structurales intermédiaires entre les fibres de type I et les fibres de type IIB. Tout comme les fibres de type IIB, l'activité ATPasique est rapide, mais leur teneur en myoglobine et leur grande vascularisation les apparentent davantage aux fibres de type I. Comme elles synthétisent l'ATP par des processus aérobie, les fibres de type IIA sont résistantes à la fatigue, mais dans une moindre mesure comparativement aux fibres de type I.

Le tableau IV résume les principales caractéristiques fonctionnelles, métaboliques et structurales des différents types de fibres.

B – Expression des protéines myofibrillaires selon le type de fibre.

Les cellules du muscle squelettique sont caractérisées par une organisation particulière des protéines contractiles en myofibrilles, résultant de l'arrangement en série d'unités répétitives, les sarcomères. Cependant, sous cette uniformité apparente, il existe un haut degré de variabilité moléculaire, 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.

Tableau V : Isoformes des protéines myofibrillaires MHC, actine, troponines, tropomyosine et MLC selon le type de muscle.

	Fibres rapides	Fibres lentes
Chaînes lourdes de myosine (MHC)	MHC-IIB MHC-IIA MHC-IIX/IID	MHC-I
MLC essentielles	MLC1-f MLC3-f	MLC1-s
MLC régulatrice	MLC2-f	MLC2-s
Actine	α -actine squelettique	α -actine squelettique
Troponines	TnC-f	TnC-s
	TnI-f	TnI-s
	TnT-f	TnT-s
Tropomyosine	Tm- α fast (Tm- β)	Tm- α fast Tm- α slow Tm- β

Le tableau V résume les différentes isoformes des protéines myofibrillaires (MHC, actine, troponines, tropomyosine et MLC) selon le type de fibres.

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 (Mizusawha et coll., 1982 ; Bortolotto et coll., 2000 ; Stevens et coll., 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 coll., 2002 ; Kischel et coll., 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 (phosphofructokinase, lactate déshydrogénase...) (Fitts et coll., 1989 ; Pette & Staron, 1990). Enfin, un certain nombre de protéines participant à la régulation de l'homéostasie calcique sont exprimées différemment ; il s'agit notamment de la parvalbumine (Huber & Pette, 1996) et de la calséquestrine (Leberer & Pette, 1986). Cette répartition est également rencontrée pour les récepteurs à ryanodine (Conti et coll., 1996 ; Bastide et coll., 2000) et pour les pompes calciques ATPase-dépendantes (MacLennan et coll., 1997).

C – Corrélation entre les propriétés d'un muscle et le pourcentage d'un type donné de fibres.

Les muscles spécialisés peuvent compter une certaine proportion d'un type donné de fibres, mais la plupart des muscles de l'organisme sont 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, sera constitué essentiellement de fibres lentes de type I, tandis que les muscles impliqués dans le mouvement sera constitué principalement de fibres rapides de type II.

Tableau VI : Proportions relatives d'un type de fibres donné selon le muscle considéré (d'après Delp & Duan, 1996).

	Fibres lentes	Fibres rapides
<i>Soleus</i>	84 %	16 %
<i>Gastrocnemius</i>	24 %	76 %
<i>Extensor digitorum longus</i>	4 %	96 %

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

A - 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 (développement et vieillesse), l'innervation, les facteurs de croissance, les hormones, l'activité neuromusculaire et la charge mécanique imposée. Les chaînes lourdes de myosine sont classiquement considérées comme les protéines typiques permettant de caractériser la plasticité musculaire.

L'atrophie fonctionnelle dans laquelle un muscle de phénotype lent acquiert un phénotype rapide peut être induite par un modèle expérimental (Morey et coll., 1979 ; Musacchia & Deavers, 1980), dans lequel le train arrière du rat est soulevé par suspension du rat par la queue ou par un harnais abdominal. L'animal peut se déplacer grâce à ses membres inférieurs, et avoir ainsi librement accès à l'eau et à la nourriture. Dans ces conditions, 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. 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.

B - 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 aux vols spatiaux. 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 coll., 1994).

Les effets de la microgravité sont variés ; tout d'abord, elle conduit à une diminution de la masse du muscle, particulièrement bien marquée pour les muscles antigravitaires tels que le soleus (Oganov et coll., 1980 ; Thomason & Booth, 1990 ; Roy et coll., 1991 ; Stevens et coll., 1993), avec une perte de poids d'environ 25% (Staron et coll., 1998) s'accompagnant d'une diminution du contenu en protéines myofibrillaires de l'ordre de 50% (McDonald & Fitts, 1995). L'atrophie reste modérée pour les muscles rapides (Thomason et Booth, 1990 ; Roy et coll., 1991 ; Jiang et coll., 1992 ; Ohira et coll., 1992 ; Edgerton & Roy, 1996). Cette atrophie est due à une diminution de la section des fibres et non à une diminution du nombre de fibres (Templeton et coll., 1988), et 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 (Steffen & Musacchia, 1985 ; Goldspink et coll., 1986 ; Thomason et coll., 1987 ; Thomason et coll., 1989 ; Edgerton & Roy, 1991).

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 (Campione et coll., 1993 ; Stevens et coll., 1993 ; Caiozzo et coll., 1994 ; Caiozzo et coll., 1996 ; Stevens et coll., 2002 ; Bastide et coll., 2002), ainsi que des protéines du réticulum sarcoplasmique comme le RyR (Bastide et coll.,

2000). La vitesse de raccourcissement des fibres de soleus est également augmentée et peut être associée aux modifications de l'expression des isoformes de MHC et de protéines régulatrices (Campione et coll., 1993 ; Caiozzo et coll., 1994 ; Caiozzo et coll., 1996). Le muscle soleus 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 (Desplanches et coll., 1987 ; Diffie et coll., 1991 ; Oishi et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1999). Cette transformation se traduit par une augmentation de l'isoforme IIA des MHC et une induction de l'isoforme IID/X qui n'est normalement pas exprimée dans le muscle soleus (Diffie et coll., 1991 ; Takahashi et coll., 1991 ; Campione et coll., 1993 ; Oishi, 1993 ; Leterme et coll., 1994 ; Stevens et coll., 1999) ainsi que de la MHCII-B (Oishi et coll., 1998 ; Caiozzo et coll., 1998 ; Cros et coll., 1999 ; Stevens et coll., 1999).

Les propriétés métaboliques sont également changées (Desplanches, 1997). Une augmentation significative des enzymes glycolytiques (lactate déshydrogénase et phosphofructokinase) est rapportée dans le soleus ; celui-ci acquiert donc des caractéristiques typiques d'un métabolisme de type glycolytique, caractéristique des fibres rapides, mais cette conversion n'est pas complète même après quatre semaines (Fitts et coll., 1989). Le potentiel oxydatif des fibres atrophiées ne serait pas modifié, puisque l'activité de certaines enzymes oxydatives (citrate synthase et succinate déshydrogénase) ou le nombre de mitochondries par unité contractile ne sont pas modifiés (Fitts et coll., 1989 ; Manchester et coll., 1990 ; Desplanches et coll., 1991). Une augmentation de la concentration en glycogène a été décrite dans le soleus en microgravité réelle ou simulée (Musacchia et coll., 1992 ; Grichko et coll., 2000 ; Fitts et coll., 2000). Enfin, les muscles lents présentent une plus grande susceptibilité à la fatigue musculaire, liée à une accélération de l'utilisation du glycogène et une diminution de la capacité à oxyder les graisses (Baldwin et coll., 1993 ; Caiozzo et coll., 1994).

Matériel
et
méthodes

I - Matériel biologique.

A - Animaux.

Les prélèvements sont réalisés sur des rats mâles adultes de souche Wistar pesant entre 260 et 300 g. Les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (3 mg.kg⁻¹). Les muscles prélevés sont immédiatement congelés dans l'azote liquide puis pulvérisés. Tous les échantillons sont conservés à -80°C avant utilisation.

B - Muscles étudiés.

Trois muscles ont été utilisés dans nos différentes études. L'un d'eux, le soleus, est un muscle extenseur de la cheville ; il s'agit d'un muscle postural de type lent, composé majoritairement de fibres lentes de type I. Ce muscle est particulièrement affecté lors d'une atrophie résultant de la non-utilisation des membres postérieurs.

Le second muscle étudié est l'extensor digitorum longus ou EDL, muscle fléchisseur de la cheville. C'est un muscle rapide, composé principalement de fibres rapides. Ce muscle ne subit aucune modification de ses propriétés contractiles et métaboliques lors de l'hypodynamie-hypokinésie.

Enfin, le troisième muscle étudié est le gastrocnemius, lui aussi muscle fléchisseur de la cheville. De taille importante, il présente l'avantage d'être constitué à la fois de fibres lentes et de fibres rapides.

C - Modèle d'hypodynamie-hypokinésie.

Ce modèle, mis au point par Morey en 1979 (Morey et coll., 1979), est un modèle largement utilisé aujourd'hui pour mimer les effets de l'absence de pesanteur sur le système musculo-squelettique de rat. Dans ce modèle, les animaux sont suspendus par la queue pendant une période de 14 ou de 28 jours, afin que les pattes postérieures ne supportent plus le poids de l'animal. Une atrophie se développe alors sur les muscles posturaux qui ne sont plus sollicités. Dans ces conditions, 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. Les animaux peuvent se déplacer sur les pattes antérieures afin d'accéder librement à l'eau et à la nourriture, la prise de nourriture et d'eau étant contrôlée journalièrement.

D – Extraction des protéines contractiles.

La poudre de muscle est resuspendue dans une solution 5 M EDTA , pH 7,0, contenant des antiprotéases (comprimés d'antiprotéases, Roche). L'échantillon est homogénéisé pendant 5 minutes, puis centrifugé 10 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Le culot est successivement lavé deux fois avec une solution de 50 mM KCl et d'antiprotéases, puis centrifugé à 13 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes.

Le culot est repris dans du tampon Laemmli, ou dans du « binding buffer » pour une purification des protéines-O-GlcNAc ou des lectines vis-à-vis du motif O-GlcNAc ; dans le second cas, l'échantillon est ensuite centrifugé 15 minutes à 10 000 rpm à 4°C pour éliminer toute trace de matériel insoluble.

II – Techniques électrophorétiques.

A – Préparation des échantillons.

La poudre de muscle est resuspendue dans le tampon approprié de l'expérience réalisée (par exemple le binding buffer pour la purification sur colonne de lectines), toujours en présence d'antiprotéases. L'échantillon est soniqué 1 minute dans la glace (Cell-Disruptor B-30), puis centrifugé à 14 000 rpm 1 heure à 4°C. Un dosage protéique est réalisé sur le surnageant selon la méthode du MicroBCA (MicroBCA™ Protein Assay reagent Kit, Pierce), permettant une détection colorimétrique et une quantification des protéines à 562 nm.

Les protéines sont ensuite précipitées à l'acétone (8 volumes d'acétone pour 1 volume d'échantillon), une nuit à -20°C. Après centrifugation à 12 000 rpm 15 minutes à 4°C, le culot protéique est resuspendu dans le tampon Laemmli (dont la composition sera décrite ci-après) en vue d'une électrophorèse monodimensionnelle, ou dans le tampon de loading (dont la composition sera décrite ci-après) en cas d'électrophorèse bidimensionnelle.

B – Electrophorèse monodimensionnelle.

Le culot protéique issu de la précipitation à l'acétone est repris par du tampon Laemmli (62,5 mM Tris/HCl ; 10 % glycérol (v/v) ; 2 % SDS (p/v) ; 5 % β -mercapto-éthanol (v/v) ; 0,02 % bleu de bromophénol (p/v) ; pH 6,8), puis chauffé 10 minutes à 95°C. Les protéines sont déposées sur un gel de gradient 10-20% en acrylamide (gel de dimension 16x20 cm, système Biorad II). La migration est réalisée dans un tampon dénaturant (0,2 M glycine ; 25 mM Tris ; 4 mM SDS), soit à ampérage constant (25 mA dans le gel de concentration, 35 mA dans le gel de séparation), soit à voltage constant (60 V sur la nuit).

A l'issue de la migration, le gel est coloré au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie, ou alors des protéines séparées par électrophorèse seront transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 μ m en vue d'analyses par Western blotting.

C – Electrophorèse bidimensionnelle.

Les protéines sont resuspendues dans 200 μ l de « loading buffer » (8 M urée ; 4 % CHAPS ; 40 mM Tris-Base ; 10 mM DTT ; 0,01 % bleu de bromophénol). Après homogénéisation, 200 μ l de tampon de réhydratation (8 M urée ; 2 % CHAPS ; 10 mM DTT ; 0,01 % bleu de bromophénol) sont ajoutés à l'échantillon. L'homogénéisation est réalisée 1 heure à température ambiante et sous agitation. L'échantillon est déposé sur un strip de 18 cm dont la gamme de pH varie de 3 à 10. La réhydratation est réalisée directement dans le système d'isoélectrofocalisation (IEF) sur la nuit. L'isoélectrofocalisation est réalisée dans le système IEF (pHaserTM Isoelectric Focusing System), avec le programme de focalisation suivant : voltage maximal : 5 000 V ; intensité maximale : 80 μ A/gel ; durée : 24 h ; volts-heure : 100 000.

Une fois l'IEF terminée, le strip est placé dans 10 ml de tampon d'équilibration I (1,5 M Tris/HCl ; 6 M urée ; 2 % SDS ; 30 % glycérol ; 0,01 % bleu de bromophénol ; 35 mM DTT ; pH 8,8) sous agitation lente pendant 10 minutes, puis de nouveau 10 minutes dans le tampon d'équilibration II (1,5 M Tris/HCl ; 6 M urée ; 2 % SDS ; 30 % glycérol ; 0,01 % bleu de bromophénol ; 87 mM iodoacétamide ; pH 8,8). Le strip est ensuite placé à la surface d'un gel de seconde dimension (SDS-PAGE).

D – Coloration au nitrate d'argent.

Après électrophorèse, le gel est placé dans la solution de fixation (50 % méthanol ; 5 % acide acétique) au minimum 30 minutes. Le gel est ensuite rincé successivement par 50 % de méthanol dans l'eau 10 minutes, puis 10 minutes dans l'eau ultrapure. La sensibilité de la coloration est augmentée par incubation du gel 1 minute dans une solution de 0,02 % thiosulfate de sodium, 20 % méthanol, 6,8 % acétate de sodium, qui sera rincé deux fois 1 minute dans de l'eau ultrapure. Le gel est ensuite incubé au minimum 1 heure dans une solution de 0,1 % de nitrate d'argent contenant 0,02 % formaline (solution de 35 % de formaldéhyde dans l'eau).

Après incubation, le gel est rincé deux fois 1 minute dans l'eau, puis la coloration proprement dite est réalisée par une solution de 2 % carbonate de sodium contenant 0,04 % formaline. Lorsque la solution de révélation devient jaunâtre, elle est éliminée et remplacée par une solution « fraîche ». Une fois l'intensité souhaitée de coloration obtenue, la coloration est stoppée par une solution de 5 % acide acétique pendant 10 minutes. Le gel est enfin rincé plusieurs fois à l'eau.

E – Coloration au bleu de Coomassie.

Après électrophorèse, le gel est placé dans la solution de coloration eau/méthanol/acide acétique (225 ml/225 ml/225 ml) contenant 2 g de Coomassie R-250 pendant deux heures sous agitation. Le gel est ensuite décoloré dans une solution eau/méthanol/acide acétique (625 ml/300 ml/75 ml) jusqu'à décoloration du fond de gel et apparition des bandes protéiques.

III – Technique de Western blot.

A – Transfert sur membrane de nitrocellulose.

Après électrophorèse (mono- ou bidimensionnelle), les protéines du gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm. Le transfert est réalisé deux heures à 200 mA dans le tampon de transfert 20 mM Tris, 150 mM glycine, 20 % méthanol, ou alors à 80 mA sur la nuit.

L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau (200 mg Ponceau S ; 3 ml ATCA ; 97 ml eau).

B – Révélation à la WGA.

Les motifs *O*-N-acétylglucosamine sont révélés par une lectine isolée du germe de blé *Triticum vulgare* : la WGA ou Wheat Germ Agglutinin. La WGA, qui reconnaît à la fois les motifs N-acétylglucosamine terminaux et les acides N-acétylneuraminiques (acides sialiques) retrouvés au niveau des glycoprotéines et des glycolipides, nécessite une N-déglycosylation préalable des protéines.

Après le transfert, la membrane est saturée par une solution de 3 % de sérum albumine bovine dans le tampon TBST (15 mM Tris ; 140 mM NaCl ; 0,05 % Tween-20) pendant 45 minutes, puis lavée deux fois 10 minutes dans le TBST. Les protéines transférées sur la membrane sont tout d'abord N-déglycosylées par action de 50 IU/ml de peptide-N-glycosidase F ou PNGase F (Biolabs) une nuit sous agitation lente dans le tampon (50 mM Tris/HCl ; pH 8,6). Après lavage de la membrane au TBST, les glycoprotéines sont désialylées par incubation de la membrane dans une solution d'acide formique pH 2,0 pendant 30 minutes à 80°C.

Après 3x10 minutes de lavage au TBST, l'HRP-WGA (horseradish peroxidase-WGA, WGA couplée à la peroxydase de radis noir) est incubée à une dilution de 1/10 000^e 1 heure sous agitation lente. La membrane est lavée 5x10 minutes au TBST, puis la détection est réalisée par chimiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham) sur film photographique (Hyperfilm MP, Kodak).

C – Révélation par anticorps.

Après transfert, la membrane est saturée par une solution de 5% de lait dans le TBST. Après deux fois 10 minutes de lavage, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire, à une dilution et avec une durée d'incubation variables selon l'anticorps utilisé. Le RL-2 ou anti-*O*-GlcNAc (Affinity BioReagent) et l'anti-MHC (Tebu) sont incubés une nuit à 4°C, respectivement à une dilution de 1/1 000^e et de 1/500^e ; l'anti-HSP70 est incubé à une dilution de 1/30 000^e, une heure à température ambiante.

Après 5x10 minutes de lavage au TBST, la membrane est incubée en présence de

l'anticorps secondaire approprié à l'anticorps primaire. Un anticorps secondaire couplé directement à la peroxydase (Amersham Biosciences) est utilisé à une dilution de 1/10 000^e dans 5 % de lait dans le TBST, 1 heure sous agitation lente, dans le cas des anti-HSP70. L'anticorps anti-*O*-GlcNAc ou RL-2 ainsi que l'anti-MHC sont révélés par utilisation d'un anticorps secondaire couplé à la biotine, lui-même reconnu par l'avidine couplée à la peroxydase (dilution au 1/10 000^e dans les deux cas, avec 5x10 minutes de lavages au TBST entre les deux incubations) (Sigma).

Après 5x10 minutes de lavage, la membrane est révélée par chimiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham) sur film photographique (Hyperfilm MP, Kodak).

IV – Purification des protéines-*O*-GlcNAc du muscle squelettique.

A – Colonne de WGA-immobilisée.

La poudre de muscle est homogénéisée dans le binding buffer (20 mM Tris/HCl ; 200 mM KCl ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM MgCl₂ ; antiprotéases, pH 7,8) par ultrasons. L'échantillon est ensuite centrifugé à 14 000 rpm à 4°C pendant une heure. Les protéines du muscle squelettiques sont N-déglycosylées par action de la PNGase F ; les protéines sont tout d'abord dénaturées par chauffage à 100°C pendant 5 minutes en présence de 0,1 % de SDS, qui sera ensuite neutralisé par ajout de 1% Triton X-100. Le tampon réactionnel (50 mM de sodium phosphate, pH 7,5) est ajouté à l'échantillon ; la PNGase F est incubée 30 minutes à 37°C. L'échantillon est dessalé par centrifugation sur Vivaspin dont la membrane a une masse moléculaire d'exclusion de 3 000 Da. L'échantillon, repris dans le binding buffer décrit précédemment, est passé sur colonne de WGA-immobilisée sur billes d'agarose (Sigma), à 4°C. La colonne est lavée par 50 volumes de colonne par le binding buffer. Une première élution est réalisée par 0,2 M de GalNAc (10 volumes de colonne) puis l'élution des protéines-*O*-GlcNAc est réalisée par 20 volumes de colonne du même tampon contenant 0,2 ou 0,5 M de GlcNAc. La fraction éluee est dessalée et concentrée par centrifugation sur Vivaspin (Vivascience) (masse moléculaire d'exclusion de 3 000 Da). Les protéines-*O*-GlcNAc ainsi purifiées sur colonne de WGA sont ensuite analysées par électrophorèses mono- ou bidimensionnelle. L'échantillon est alors soit repris dans du tampon Laemmli, chauffé 10 minutes à 95°C et analysé en électrophorèse monodimensionnelle, ou repris dans

les tampons 2D (tampon de loading et tampon de réhydratation) décrits précédemment en vue d'une analyse par électrophorèse bidimensionnelle.

Les protéines peuvent également être purifiées en « batch ». Dans ce cas, les billes de WGA sont incubées en présence de l'échantillon une heure à 4°C. Les billes sont culottées par centrifugation ; quatre lavages successifs des billes sont successivement réalisés avec le tampon de binding décrit précédemment. Une élution des protéines fixées sur les billes peut être réalisée en présence de GlcNAc (de 0,2 M ou 0,5 M de GlcNAc, dans le tampon de binding décrit précédemment). Le culot de billes est ensuite repris par 100 µl de Laemmli, chauffé 10 minutes à 95°C puis analysé par SDS-PAGE.

B – Immunoprécipitation avec le RL-2.

500 µg de protéines musculaires sont reprises dans du tampon RipA (10 mM Tris/HCl ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 % Triton X-100 ; 0,5 % déoxycholate de sodium ; 0,1 % SDS ; pH 7,4 ; antiprotéases). L'anticorps anti-*O*-GlcNAc RL-2 est incubé sur la nuit à une dilution de 1/250°) à 4°C sous agitation lente. La protéine G couplée à des billes de Sépharose est ensuite ajoutée pour une incubation d'une heure à 4°C à une dilution de 1/15°. A l'issue de cette incubation, les billes de protéine G sont culottées par centrifugation, et le surnageant est éliminé. Quatre lavages successifs du culot de billes sont ensuite réalisés : le premier avec le tampon RipA ; le second avec 90 % RipA et 10 % NaCl 5 M ; le troisième avec 50 % RipA et 50 % TNE (TNE : 10 mM Tris/HCl ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; pH 7,4 ; antiprotéases) ; et enfin le dernier avec 100 % TNE.

Les billes sont ensuite resuspendues dans 100 µl de tampon Laemmli puis chauffées 10 minutes à 95°C ; les protéines-*O*-GlcNAc ainsi purifiées peuvent être analysées par électrophorèse monodimensionnelle.

V – Purification de lectines musculaires reconnaissant le motif *O*-GlcNAc.

500 µg de protéines musculaires sont resuspendues dans le tampon de binding (20 mM Tris/HCl, 200 mM KCl ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM MgCl₂ ; pH 7,8 ; antiprotéases). Les lectines reconnaissant le motif *O*-GlcNAc sont purifiées sur colonne de billes de GlcNAc (résidus de N-acétylglucosamine couplés à des billes d'agarose) (Sigma) ; le protocole suivi est le même que celui décrit pour la colonne de WGA.

Une autre méthodologie peut également être utilisée. Dans ce cas, les billes de GlcNAc (à une dilution de 1/10^o par rapport au volume de l'échantillon) sont incubées en présence de l'échantillon une heure à 4°C. Les billes sont culottées par centrifugation ; quatre lavages successifs des billes sont successivement réalisés avec le tampon de binding décrit précédemment. Une élution des lectines est réalisée en présence de concentrations croissantes de GlcNAc (de 0,05 M à 0,5 M de GlcNAc, dans le tampon de binding décrit précédemment). Le culot de billes est ensuite repris par 100 µl de Laemmli, chauffé 10 minutes à 95°C puis analysé par SDS-PAGE.

VI – Identification des protéines par spectrométrie de masse.

A – Réduction – Alkylation.

Les bandes (si électrophorèse monodimensionnelle) ou spots (si électrophorèse bidimensionnelle) de protéines sont excisés du gel. Les fragments de gel sont d'abord décolorés par une solution de 30 mM ferricyanure de potassium, 100 mM thiosulfate de sodium sous agitation (en cas de coloration au nitrate d'argent) ou décolorés dans une solution eau/méthanol/acide acétique (625 ml/300 ml/75 ml) (en cas de coloration au bleu de Coomassie) puis rincés successivement plusieurs fois par de l'eau ultrapure. Les particules de gel sont ensuite déshydratées par rinçages successifs avec de l'acétonitrile, jusqu'à ce que le fragment de gel devienne blanchâtre ; le séchage est terminé au speed-vac.

Le fragment de gel est ensuite réhydraté par une solution de 10 mM dithiothréitol dans 100 mM bicarbonate d'ammonium à 56°C pendant 30 minutes ; les protéines ainsi réduites sont alkylées par une solution de 55 mM iodoacétamide dans 100 mM bicarbonate d'ammonium, 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les fragments de gel sont ensuite rincés par 100 mM bicarbonate d'ammonium, déshydratés par rinçages successifs à l'acétonitrile puis séchés au speed-vac.

B – Digestion « en gel ».

La digestion des protéines est réalisée par la trypsine (Promega), endoprotéase hydrolysant les liaisons peptidiques dans lesquelles la lysine ou l'arginine engage sa fonction

acide.

Les fragments de gel sont réhydratés par une solution de 5 à 12,5 ng/μl de trypsine (selon la taille du fragment de gel) dans une solution de 5 mM CaCl₂ dans 100 mM bicarbonate d'ammonium ; le volume de tampon contenant la trypsine ajouté doit être suffisant pour recouvrir le fragment de gel. La réhydratation est réalisée 30 minutes à 4°C. A l'issue de la réhydratation, l'excès de tampon contenant la trypsine est éliminé et remplacé par du tampon sans enzyme, de manière à bien recouvrir le gel. La digestion est réalisée à 37°C sur la nuit.

C – Extraction des peptides.

Après la digestion trypsique, les peptides sont extraits des particules de gel. Après addition de 50 μl de 25 mM de bicarbonate d'ammonium, les fragments de gel sont agités 15 minutes à température ambiante ; le surnageant contenant les peptides les plus hydrophiles est récupéré. Deux extractions successives de 20 minutes sous agitation sont réalisées avec un mélange acétonitrile/eau/acide formique (45/45/10, v/v/v), et les surnageants sont poolés avec le premier aliquote de bicarbonate d'ammonium. Une dernière extraction est réalisée avec un mélange acétonitrile/acide formique (95/5, v/v), également 20 minutes sous agitation ; ce surnageant contenant les peptides les plus hydrophobes est poolé avec les premiers aliquotes.

D – Microdessalage sur Zip-TipC₁₈.

Les solutions contenant les peptides extraits du gel sont séchées par évaporation au speed-vac. Les peptides sont resuspendus dans 10 μl d'eau/TFA 0,1 %, puis le dessalage de l'échantillon peptidique est réalisé par chromatographie en phase inverse, sur colonne de Zip-Tip C₁₈ (Millipore).

La colonne est d'abord activée par le méthanol, puis lavée avec de l'eau contenant 0,1% acide trifluoroacétique (TFA). La fixation des peptides sur la colonne se fait par aller-retours successifs du Zip-Tip dans la solution peptidique, puis l'élution des peptides est réalisée, après rinçage de la colonne dans de l'eau/TFA 0,1 %, dans 5 μl de 0,1% TFA dans un mélange acétonitrile/eau (60/40, v/v). Les échantillons peptidiques dessalés sont séchés au speed-vac.

E – Spectrométrie de masse.

1 – Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

L'identité des protéines est déterminée à partir de l'empreinte peptidique obtenue par spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight ; ionisation/désorption par tir laser assisté par matrice et mesure du temps de vol) sur un spectromètre de masse de type Voyager DE-STR PRO.

Les échantillons peptidiques sont resuspendus dans 3 µl d'eau/TFA 0,1 % ; un microlitre d'échantillon est déposé sur une cible MALDI en présence d'un microlitre de matrice préparée extemporanément (acide 2, 5-dihydroxybenzoïque à une concentration de 10 mg/ml dans un mélange méthanol/eau, 70/30, v/v). Les mesures de masse moléculaire des peptides sont réalisées sur un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'un réflectron et d'un laser à azote pulsé (longueur d'onde de 337 nm, durée de pulse de 3 nsec). Les ions sont accélérés par un potentiel électrique de 6 keV. 150 à 200 acquisitions sont réalisées par échantillon, et chaque spectre est ensuite calibré en utilisant la masse monoisotopique des fragments peptidiques résultant de l'autoprotéolyse de la trypsine (ions 842,5100 ; 1045,5642 et 2211,1046).

2 – Spectrométrie de masse en tandem.

Les analyses sont réalisées sur un spectromètre de masse de type Q-Star Pulsar (Hybrid Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer, PE Sciex Instruments) équipé d'un nanoélectrospray (Protana).

Les peptides sont dissous dans 10 µl d'un mélange méthanol/eau (50/50, v/v) contenant 0,1% d'acide formique. La solution de peptides est introduite dans un capillaire en verre borosilicaté (Protana). Une tension de 800 V est appliquée au capillaire grâce à un filament métallique plongé dans la solution de peptides. Le potentiel permettant de séparer des peptides de masse proche varie entre -15 et -50 V, et le potentiel de focalisation est de -220 V. Les ions moléculaires (ions précurseurs) sont sélectionnés dans un analyseur de type quadripole, et partiellement fragmentés dans une cellule de collision, le gaz de collision (N₂) étant à une pression de 4.10⁻⁵ Torr (1 Torr = 133,3 Pa). L'énergie de collision varie entre -40 et -55 eV selon l'échantillon.

Le spectre Q-Star résulte de l'accumulation de 10 cycles de balayage sur une gamme de m/z de 500 à 2 000 Da pour l'analyse MS, et sur une gamme de 150 à 2 000 Da pour les analyses MS/MS. Tous les signaux sont résolus de manière monoisotopique.

F – Recherche dans les banques de données.

La recherche dans les banques de données est réalisée grâce au module MS-Fit du moteur de recherche Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>). La recherche est réalisée dans les banques de protéines Swiss-Prot et NCBI. D'autres moteurs de recherche tels que ProFound (<http://prowl/rockefeller.edu/>) ou Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) ont également été utilisés.

La masse monoisotopique de l'ensemble des pics du spectre MALDI est utilisée pour l'interrogation des banques de données. La masse moléculaire apparente de la protéine, déterminée à partir des gels d'électrophorèse, est considérée avec une erreur de 20 % ; grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle, le point isoélectrique de la protéine peut également être utilisé pour l'interrogation des banques de données, avec une erreur de plus ou moins une unité de pH. La carbamidométhylation des cystéines, l'oxydation des méthionines ainsi qu'une possible modification des cystéines par l'acrylamide sont également des critères considérés lors de la recherche de l'identité d'une protéine. Enfin, on admet une erreur de masse 0,05 Da pour la masse moléculaire des peptides.

A l'issue de l'interrogation des banques de données, plusieurs candidats peuvent être possibles. Les critères qui permettront de déterminer l'identité de la protéine seront le nombre de peptides du spectre appartenant à l'empreinte peptidique de la protéine, le pourcentage de séquence recouverte, le « score »... Si nécessaire, des informations partielles de la séquence des peptides peuvent être obtenues par fragmentation ; on vérifie alors que la séquence d'un peptide donné correspond bien à la séquence du peptide théorique de l'empreinte peptidique.

VII - Méthode de vérification rapide de la modification par O-GlcNAc d'une protéine donnée.

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE, puis transférées sur membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). Les bandes protéiques d'intérêt sont excisées de la membrane,

puis soumises à une β -élimination en milieu réducteur (NaOH, 0,1N ; BH_4Na , 1 M) 18 heures à 45°C. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide acétique (tubes mis dans la glace). Après évaporation sous azote, l'ajout de méthanol, suivi d'une nouvelle évaporation, permet d'éliminer les méthylborates. Cette étape est réalisée deux fois. L'échantillon sec est repris dans 1 ml d'anhydride acétique, dans le but de peracétyler les alditols obtenus après β -élimination. La réaction est réalisée 4h à 100°C. Les alditols peracétylés sont ensuite extraits par du chloroforme.

La phase chloroformique est analysée par chromatographie en phase gazeuse. La colonne capillaire (BPX 70 ; 30 m \times 0.32 mm) a une phase stationnaire en cyanopropyl (polysilphénylène-siloxane). Le gradient de température est de 150 à 250°C (150 à 230°C à raison de 3°/min, puis 230 à 250°C à raison de 5°/min).

VIII – Détermination des sites de O-GlcNAc.

Un marquage des protéines-O-GlcNAc est réalisé par la galactosyl transférase selon le protocole décrit paragraphe IX-A ci-après). Deux pools protéiques sont utilisés : le premier est marqué en présence de 0,5 μCi de galactose tritié, et le second en présence de 10 μg d'UDP-galactose froid. Les protéines musculaires ainsi marquées sont séparées par électrophorèse monodimensionnelle. Après coloration, les bandes protéiques d'intérêt sont excisées du gel puis soumises à une digestion trypsique en gel selon le protocole décrit précédemment. La seule différence réside au niveau des extractions des peptides, à savoir que les solutions utilisées sont deux bains successifs d'acétonitrile 45% et 0,1% TFA, et un dernier bain d'acétonitrile 95% + 0,1% TFA. La solution peptidique est séchée au speed-vac.

Les peptides issus de la digestion trypsique sont resuspendus dans 80 μl d'une solution de 0,1 % TFA dans l'eau et la solution est filtrée par centrifugation rapide sur colonne Vivaspin (Vivascience). Les peptides sont ensuite séparés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La colonne utilisée est une colonne Terra (Waters) de phase C_{18} , de 1x150 mm. Deux tampons sont utilisés : le tampon A (0,1 % TFA dans l'eau) et le tampon B (0,08 % TFA dans l'acétonitrile). La colonne fonctionne à un débit de 150 $\mu\text{l}/\text{minute}$, avec un gradient d'une heure de 0 à 70 % d'acétonitrile. Un palier est ensuite réalisé à 100 % en acétonitrile pour laver la colonne. La détection des peptides se fait par lecteur UV.

On sépare tout d'abord les peptides issus de l'échantillon radiomarqué ; les 80 fractions obtenues après séparation des peptides par HPLC sont comptées en scintillation

liquide après ajout de 1 ml de liquide scintillant Aquasafe. On obtiendra alors un (ou plusieurs) pic(s) de radioactivité correspondant à la (aux) fraction(s) contenant le(s) peptide(s) radiomarqué(s) et par là-même le(s) peptide(s) porteur(s) du motif *O*-GlcNAc. Les peptides marqués au galactose froid sont séparés de la même manière, et la (ou les) fraction(s) contenant le(s) peptide(s) glycosylé(s), correspondant à la (ou aux) fraction(s) radioactive(s), est (sont) récupérée(s) puis analysée(s) en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

IX – Détermination du taux global de *O*-GlcNAc.

A – Autogalactosylation de la galactosyltransférase.

La GlcNAc- β (1,4)-galactosyltransférase (lactose synthase) est tout d'abord autogalactosylée par incubation de 25 unités d'enzyme dans 1 ml de tampon 50 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM β -mercaptoéthanol, 1 % aprotinine v/v, 0,4 mM UDP-galactose, pH 7,3, pendant 30 minutes à 37°C. L'enzyme est ensuite concentrée par précipitation avec une solution saturée de sulfate d'ammonium (solution à 85 %).

L'enzyme est ensuite conservée à -20°C à une concentration de 20 à 30 U/ml dans 25 mM Hepes/NaOH, 5 mM CaCl₂, 50 % glycérol, pH 7,3.

B – Dosage du taux de *O*-GlcNAc.

Le taux global de *O*-GlcNAc est déterminé sur 100 μ g de protéines musculaires par marquage radioactif. A un volume de 50 μ l d'échantillon est ajouté 50 mU de galactosyltransférase, diluée dans 10 μ l de tampon de marquage 10X (100 mM Hepes/NaOH ; 100 mM galactose ; 50 mM MnCl₂ ; pH 7,3). Le volume est ajusté à 90 μ l avec de l'eau. La réaction est initiée par l'addition de 10 μ l de 25 mM 5'-AMP contenant 3 μ Ci d'UDP-[³H]Gal, afin d'arriver à une concentration finale de 2,5 mM de 5'-AMP. L'échantillon est incubé 2 heures à 37°C en présence de 40 μ M de PUGNAc (*O*-(2-acétamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phénylcarbamate). La réaction est stoppée par chauffage 5 minutes à 95°C. Le précurseur radioactif est éliminé par passage sur une colonne de Dowex 1x2 sous sa forme acétate. La colonne est rincée par 1 ml d'eau ultrapure, et la fraction non retenue est comptée en scintillation liquide après addition de 3 ml de liquide scintillant

Aquasafe ; le comptage est réalisé à l'aide d'un appareil Beckman de type LS6000TA.

Le taux de *O*-GlcNAc marqué au galactose tritié est déterminé en considérant la radioactivité spécifique de l'UDP-[³H]Gal, ainsi que l'efficacité du comptage. Le dosage est réalisé en duplicate pour chaque groupe de muscle, sur six muscles différents.

C – Vérification de la spécificité du marquage.

Le but est de vérifier que la galactosyltransférase a transféré le résidu de galactose tritié sur le motif *O*-GlcNAc et sur lui seul.

100 µg de protéines radiomarquées sont utilisées pour la caractérisation des sucres radiomarqués. Les protéines sont tout d'abord N-déglycosylées par action de la PNGase F (voir protocole paragraphe IV-A), puis soumises à une β-élimination en milieu réducteur. La β-élimination est réalisée dans une solution de 0,1 M NaOH, 1 M BH₄Na, 18 heures à 45°C. La réaction est stoppée par l'addition de Dowex 50x8 sous sa forme H⁺ dans la glace. La résine est ensuite éliminée par filtration sur laine de verre. La solution contenant les N-glycannes et les produits issus de la β-élimination est dessalée sur colonne de C₁₈ (Alltech) équilibrée dans une solution aqueuse de 0,1% TFA. L'élution est réalisée par une solution de 0,1% TFA dans un mélange eau/acétonitrile (40/60, v/v). L'échantillon est séché au speed-vac, puis resuspendu dans 10 µl d'eau.

L'analyse est réalisée par chromatographie sur couche mince ; la migration est réalisée dans un mélange butanol/acide acétique/eau (40/20/30, v/v/v) en présence d'un standard de N-acétyl-lactosaminitol radiomarqué. La révélation des saccharides est faite par pulvérisation d'orcinol sulfurique sur la plaque de chromatographie après une autoradiographie d'un mois.

X – Dosage des activités enzymatiques.

A – *O*-GlcNAc transférase.

Le dosage de l'activité *O*-GlcNAc transférase est réalisé sur 200 µg de protéines musculaires. La réaction est réalisée dans un tampon contenant 50 mM cacodylate de sodium, 5 mM CaCl₂, 2,5 mM 5'-AMP, pH 6,5, en présence de 100 nmol du peptide synthétique YSDSPSTST et 0,5 µCi d'UDP-[¹⁴C]GlcNAc. La réaction est réalisée 2h30 à température

ambiante, puis stoppée par addition d'acide formique (concentration finale de 45 mM). Le précurseur radioactif est éliminé par passage sur une colonne de C₁₈ équilibrée dans 50 mM acide formique. L'élution est réalisée par un mélange acétonitrile/eau (50/50, v/v). Après évaporation, l'échantillon est resuspendu dans 500 µl d'eau puis compté en scintillation liquide sur un appareil Beckman LS6000TA.

L'activité de la *O*-GlcNAc transférase est déterminée en considérant l'activité spécifique de l'UDP-[¹⁴C]GlcNAc et l'efficacité du comptage. Le dosage est réalisé en duplicate pour chaque groupe de muscle, sur trois muscles différents (mêmes muscles que ceux utilisés précédemment).

B – *O*-GlcNAcase.

Le dosage de l'activité *O*-GlcNAcase est réalisé par réaction colorimétrique sur 200 µg de protéines musculaires. La réaction est réalisée dans un tampon 50 mM cacodylate de sodium, 1 mM GalNAc, 2 mM PNP-GlcNAc, pH 6,5. L'échantillon est incubé deux heures à 37°C, puis la réaction est stoppée par addition de carbonate de sodium (concentration finale de 45 mM). La quantité de PNP libérée est déterminée par mesure de la densité optique à 415 nm (système Microplaque Reader Biorad 550).

L'activité est déterminée par rapport à une gamme étalon de PNP. Le dosage est réalisé duplicate pour chaque groupe de muscle, sur trois muscles différents (mêmes muscles que ceux utilisés précédemment).

C – Expression des taux d'ARNm de la *O*-GlcNAc transférase et de la *O*-GlcNAcase.

Les muscles squelettiques de rats mâles de souche Wistar d'environ 300 g anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sont prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide pour une extraction ultérieure des ARNm. L'isolement des ARNm est réalisé par l'intermédiaire du kit « MicroPolyA Pure » (Ambion). Les ADNc sont ensuite amplifiés par RT-PCR (reverse transcription – polymérase chain reaction) (Titan One Step RT-PCR kit, Roche). Les primers ont été sélectionnés à partir des séquences de la *O*-GlcNAc transférase et de la *O*-GlcNAcase (Kreppel et coll., 1997 ; Liu et coll., 2002).

Pour la *O*-GlcNAc transférase, le primer sens GGGTTAGCTGAGTTGGCACAT et le

primer antisens CTGTCCAGCCTTCGACACTGG sont utilisés pour amplifier un fragment de 151 pb. Pour la *O*-GlcNAcase, le primer sens AGAGTGAGCGCAACGCCAATC et le primer antisens TTCGGAGCATAACAAGTATGTA sont utilisés pour amplifier un fragment de 252 pb. La séparation des ADNc est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose (3% agarose, Molecular Screening, Roche). Deux autres oligonucléotides (primer sens GGGAAATCCATATGTCAGACACCGAAGAACA ; primer antisens CATGCCATGGTCA CTTCCAGCGGCCTCCAAC) sont utilisés pour amplifier le transcript de la GAPDH, en tant que contrôle de la quantité d'ARN pour chaque échantillon. L'analyse densitométrique est réalisée par l'utilisation d'un système Quantiscan (Biorad).

XI – Dosage du taux de phosphate.

Les échantillons de protéines musculaires sont repris dans 20 mM tartrate de sodium et de potassium, puis soniqués. Ils sont ensuite centrifugés une heure à 14 000 rpm, puis dessalés sur Centricon Vivaspinn dont la masse moléculaire d'exclusion est de 10 000 Da. Les échantillons ainsi dessalés sont dosés au MicroBCA. Le dosage de phosphate est réalisé sur 200 µg de protéines.

Les échantillons lyophilisés sont resuspendus dans 100 µl d'HCl 1 M. L'hydrolyse est réalisée 7 heures à 100°C. A l'issue de l'hydrolyse, les échantillons séchés sont resuspendus dans 100 µl d'eau ultrapure puis analysés par HPLC sur une colonne de type IonPac® AS18 (2x250 mm) et une colonne de garde de type IonPac® AG18 (2x50 mm) ; la suppression est réalisée avec ASAR Ultra 2x4 mm. L'éluent est une solution de soude 33 mM à un flux de 0,25 ml/min. Les ions phosphate sont détectés par conductimétrie.

XII – Etude de l'influence de la *O*-GlcNAc sur les relations tension/pCa

A – Protocole de « pelage » chimique des biopsies.

Une fois prélevées, les biopsies musculaires sont soumises au protocole de pelage. Le « pelage » d'une fibre musculaire permet d'avoir libre accès aux protéines contractiles, motrices et régulatrices, impliquant l'élimination du sarcolemme. Cette technique présente deux intérêts majeurs : elle permet d'une part de s'affranchir de la commande motrice,

puisque la contraction musculaire se fera par application externe de calcium, et d'autre part, elle permet une analyse du contenu protéique d'une cellule unique. Le pelage chimique consiste à hyperperméabiliser les membranes sarcolemmiques par application d'éthylène glycol-bis (2-amino-éthyléther)-N, N',N',N'-tétra-acétique acide (EGTA). En chélatant le Ca^{2+} , ce composé déstructure les membranes et le système tubulaire transverse sans altérer les protéines contractiles sous-jacentes (Eastwood et coll., 1976), et sans modifier la sensibilité calcique des protéines (Reuben et coll., 1977), qui seront ainsi directement accessibles. Cette technique, adaptée aux fibres de petits diamètres, permet de traiter simultanément l'ensemble des fibres, et l'isolement ultérieur d'une fibre est grandement facilité.

Des biopsies fraîchement prélevées du soleus sont placées dans une solution relaxante R (170 mM propionate de potassium ; 2,5 mM acétate de magnésium ; 5 mM K_2EGTA ; 20 mM MOPS ; 2,5 mM ATP). Après quatre heures, les biopsies sont rincées dans la solution R puis replacées dans la solution R pour une durée de vingt-quatre heures. Les biopsies sont ensuite placées dans une solution de conservation C (170 mM propionate de potassium ; 2,5 mM acétate de magnésium ; 5 mM K_2EGTA ; 20 mM MOPS ; 50% (v/v) glycérol ; 1 $\mu g/ml$ pepstatine A ; 5 mg/mL leupeptine). Les inhibiteurs de protéases préviennent de toute perte de force pouvant résulter de la dégradation des protéines, sans avoir d'effet propre sur l'activation calcique des fibres traitées. Les biopsies sont ainsi conservées à $-20\text{ }^\circ C$ jusqu'à un mois.

B – Mesure de la tension isométrique.

1 – Isolement des fibres.

Les biopsies utilisées dans ce travail sont âgées de deux ou trois semaines. L'isolement de fibres de 6 à 8 mm s'effectue sous loupe binoculaire (x 80). Un fil de soie est noué à chaque extrémité d'un segment de 5 mm, ce qui permet de monter la fibre entre une pince fixe et un capteur de force dans une cuve expérimentale contenant la solution R. Un système d'aspiration sous vide permet l'évacuation des solutions de la cuve expérimentale. Le diamètre de la fibre est déterminé à l'aide d'un micromètre intégré à l'oculaire. La longueur des sarcomères est déterminée à l'aide d'un faisceau laser hélium/néon perpendiculaire à l'axe de la fibre. En traversant la fibre, le faisceau est diffracté par les sarcomères dont l'arrangement caractéristique est assimilable à un réseau de fentes. Les bandes de diffraction

de premier ordre sont visualisées sur un écran calibré placé derrière la fibre permettant la lecture directe de la longueur de sarcomère au repos. La fibre est ensuite étirée à 120 % de sa longueur de sarcomère au repos, permettant ainsi le développement d'une force isométrique optimale.

Le dispositif d'enregistrement des tensions isométriques est schématisé figure 32.

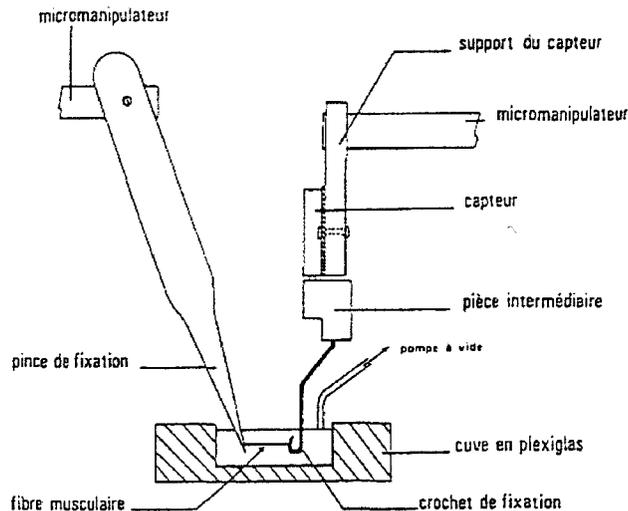


Figure 32 : Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques.

2 - Enregistrement des tensions isométriques.

Le capteur de force permettant de détecter des tensions isométriques est relié à un amplificateur (10 V/g). Les tensions sont ensuite transcrites sur un enregistreur graphique. L'activation des fibres s'effectue par application de solutions de concentrations calciques croissantes. Pour éliminer toutes traces d'EGTA issue de la solution R, la cuve est rincée avec une solution de rinçage W (185 mM propionate de potassium ; 2,5 mM acétate de magnésium ; 20 mM MOPS).

On applique ensuite une solution pCa ($pCa = -\log[Ca^{2+}]$) contenant de l'ATP (figure 33). Une fois la tension P résultante stabilisée, on applique une solution saturante en Ca^{2+} (pCa 4,2). Ce protocole permet de normaliser les tensions sous-maximales P à la tension maximale P_0 que la fibre peut développer. Ceci permet de s'affranchir de la variabilité possible de P_0 d'une fibre à l'autre et de la perte de force éventuelle qui survient progressivement au cours des activations successives. Cette perte de force se produit naturellement en raison des contraintes mécaniques consécutives aux activations maximales

répétées (déstructuration de la fibre). Le rapport calcique est établi pour des concentrations calciques allant de pCa 7,0 à pCa 4,2, par pas de 0,2 unités pCa. Les tensions normalisées P/P_0 sont reportées en fonction de la pCa pour constituer les relations T/pCa qui sont des courbes de type sigmoïde.

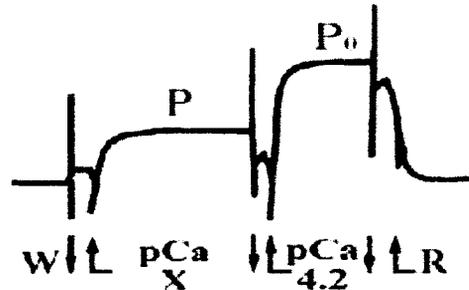


Figure 33 : Exemple d'un cycle expérimental.

Les solutions activatrices sont confectionnées à partir des mêmes composants que la solution W. Le Ca^{2+} libre est tamponné par du K_2EGTA et du $CaEGTA$ (ou $SrEGTA$) additionnés en proportions adéquates suivant le programme Fabiato (Fabiato, 1988) pour obtenir des concentrations comprises entre pCa 7,0 et pCa 4,2. La force ionique est fixée à 200 mM, le pH ajusté à $7,00 \pm 0,1$. La concentration en ATP est constante (2,5 mM).

3 - Expression des résultats.

La courbe T/pCa obtenue est de type sigmoïde (figure 34). La sensibilité et l'affinité calcique du système contractile sont respectivement déterminées par le seuil d'activation (concentration minimale en calcium nécessaire pour induire une tension) et le critère pCa_{50} (concentration nécessaire en calcium pour induire 50 % de la tension maximale P_0 ; c'est un indicateur de l'affinité calcique). La coopérativité au sein des myofilaments qui traduit les interactions entre les protéines du filament fin (coopérativité entre les sites régulateurs de la troponine C et les protéines régulatrices du filament fin) est évaluée par les deux coefficients de pentes (coefficients de Hill n_1 et n_2). Un seul coefficient de Hill (n_H) est utilisé lorsque les courbes sigmoïdes sont symétriques par rapport au point P correspondant à la pCa_{50} . Cependant, la détermination de deux coefficients permet une meilleure adéquation des points expérimentaux avec la courbe théorique décrite par l'équation de Hill lorsque la sigmoïde n'est pas régulière.

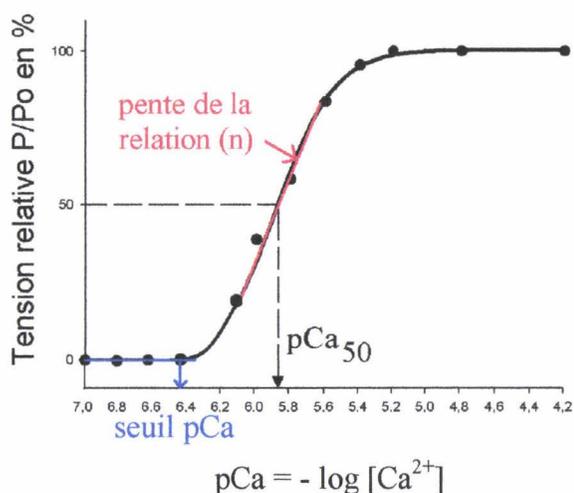


Figure 34 : Relation T/pCa .

C - Rôles de la O-GlcNAc dans l'activité contractile des fibres musculaires.

1 - Mise en évidence d'un rôle éventuel de la O-GlcNAc dans un processus d'interaction protéine-protéine.

Des fibres de 5 mm ont été isolées et placées dans le dispositif d'enregistrement des tensions isométriques. Après étirement de la fibre à 120% de sa longueur de sarcomère au repos, la fibre est soumise à un traitement au Brij 58 (2 % dans la solution R) pour éliminer un éventuel effet du réticulum sarcoplasmique (RS) sur les paramètres d'activation calcique. Le Brij 58 est un détergent cétonique non ionique, qui élimine irréversiblement la capacité du RS à emmagasiner et à relarguer le Ca^{2+} , sans altérer le système contractile. Deux protocoles sont alors utilisés :

- l'un des protocoles (figure 35-A) consiste en une incubation d'une heure de la fibre dans la solution R+ATP, suivie d'une incubation dans du R+ATP en présence de 0,2 M de GlcNAc, de GalNAc ou de glycérol. Après chaque incubation, une relation T/pCa est réalisée en présence ou en absence de GlcNAc, de GalNAc ou de glycérol ;
- dans le second protocole (figure 35-B), la fibre subit deux incubations d'une heure chacune en présence de la molécule à tester dans du R + ATP. Comme précédemment, après chaque incubation, on effectue une relation T/pCa en présence de la molécule à tester.

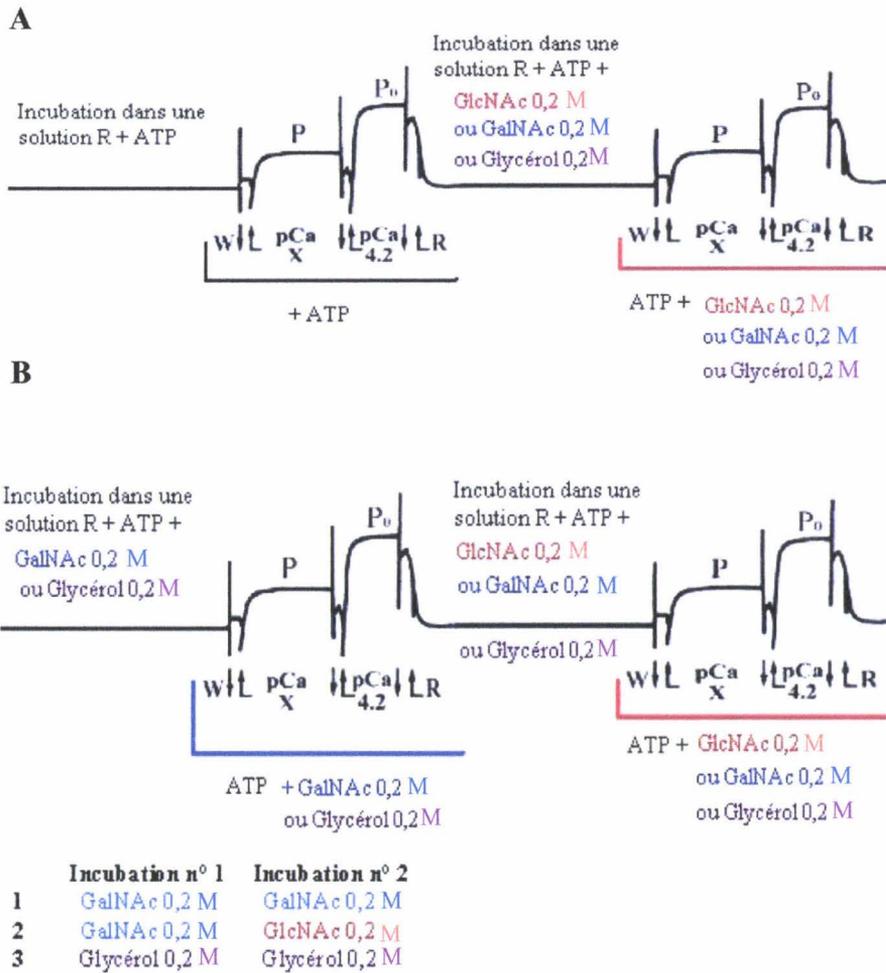


Figure 35 : Protocoles expérimentaux suivis pour la mise en évidence d'un rôle de la *O*-GlcNAc dans un processus d'interaction protéine-protéine.

2 - Mise en évidence d'un rôle des motifs *O*-GlcNAc libres sur l'activité contractile.

Les fibres sont incubées une heure dans une solution R contenant de l'ATP et de la WGA à une concentration de 0,1 mg/mL ou 1 mg/mL. Après cette incubation, les relations T/pCa sont établies.

XIII - Analyses statistiques

Les résultats des dosages des taux de *O*-GlcNAc, des activités enzymatiques et des relations T/pCa sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leurs erreurs standards

Matériel et méthodes

moyennes (SEM).

Après analyse de la variance par un test ANOVA, les différences entre les différents groupes sont analysées par un test de Student.

Une probabilité $p < 0,05$ est considérée comme significative.

Résultats
et
discussions

Première partie

*Identification des
protéines-O-GlcNAc dans
le muscle squelettique*

I – Problématique.

Lorsque ce travail a débuté, il n’existait dans la bibliographie que très peu de données concernant la O-N-acétylglucosaminylation dans le muscle squelettique. De plus, les études de la O-GlcNAc réalisées jusqu’alors dans ce tissu ne considéraient le muscle squelettique qu’en tant que modèle de tissu insulino-dépendant (Yki-Järvinen et coll., 1997 ; MacClain et coll., 2002 ; Arias et coll., 2004). Pourtant, le muscle squelettique est un modèle de choix quant à l’étude de la O-GlcNAc, puisque d’une part son métabolisme dépend fortement du glucose, et d’autre part car des mécanismes clé du muscle squelettique, tels que la contraction musculaire par exemple, dépendent fortement de la phosphorylation. De plus, le muscle squelettique est une structure plastique pouvant adapter son métabolisme énergétique aux conditions physiologiques. Or, il est aujourd’hui largement admis que la O-N-acétylglucosaminylation dépend à la fois du glucose, mais également de la phosphorylation au sein de la balance existant entre la O-N-acétylglucosaminylation et la phosphorylation.

Il nous a donc semblé nécessaire dans un premier temps d’identifier les protéines du muscle squelettique portant le motif O-N-acétylglucosamine, afin de définir si la O-GlcNAc pourrait exercer une fonction physiologiquement importante dans le muscle squelettique. Une approche protéomique a donc été envisagée pour l’identification de ce type de protéines. Ces travaux ont fait l’objet d’une publication dans le journal *Molecular and Cellular Proteomics* (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).

II – La protéomique : définition.

Le protéome désigne l’ensemble des protéines exprimées à un moment donné dans une cellule, un tissu ou un organe. L’analyse protéomique permet une description de la régulation de l’expression des gènes grâce à l’étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles. L’approche protéomique est basée sur l’utilisation de différentes techniques :

- l’électrophorèse bidimensionnelle, permettant de séparer plusieurs milliers de protéines d’un même échantillon ;

Première partie – Identification des protéines-O-GlcNAc du muscle squelettique

- la spectrométrie de masse, permettant d'identifier ces protéines et de mettre en évidence leurs modifications post-traductionnelles ;
- la bioinformatique, permettant une quantification du niveau d'expression d'une protéine, ainsi que le constitution de bases de données.

La protéomique constitue aujourd'hui un outil puissant permettant l'identification de marqueurs associés à une pathologie ainsi que l'identification de cibles thérapeutiques.

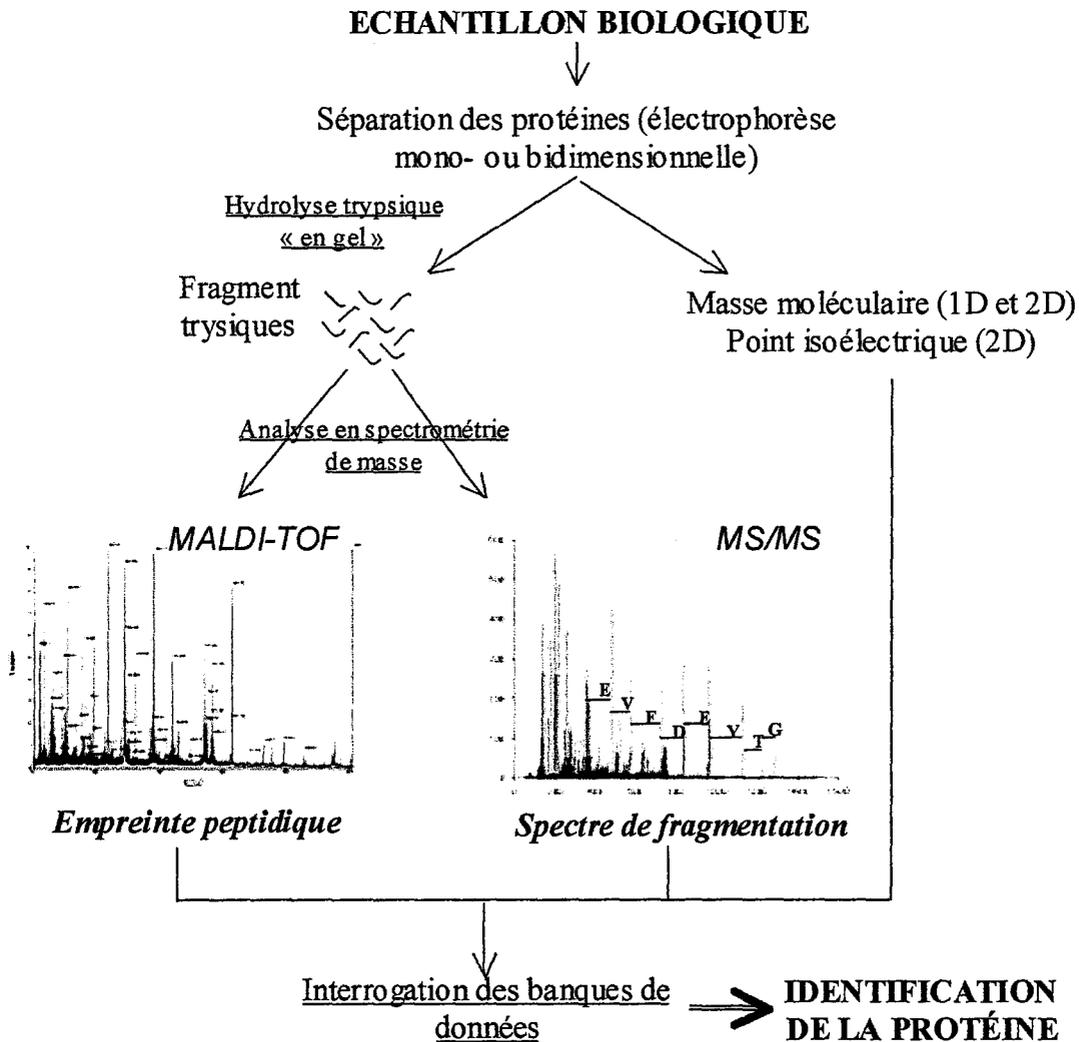


Figure 36 : Principe de l'analyse des protéines par approche protéomique.

La méthodologie utilisée pour l'analyse protéomique est représentée figure 36. L'échantillon biologique peut être de nature très variable : il peut s'agir d'un type cellulaire, d'un tissu, d'un organelle... Les protéines sont séparées par électrophorèse mono- ou bidimensionnelle, permettant une séparation des protéines fonction de leur masse moléculaire dans le cas de l'électrophorèse monodimensionnelle, ou en fonction de leur point isoélectrique

(première dimension ou isoélectrofocalisation) puis en fonction de leur masse moléculaire (deuxième dimension ou SDS-PAGE) dans le cas de l'électrophorèse bidimensionnelle. Après coloration du gel, les protéines sont visualisées sous forme d'un spot ; ceux-ci sont excisés du gel, puis soumis à une hydrolyse protéolytique, généralement par la trypsine. Après extraction du gel, les peptides résultant de l'hydrolyse trypsique sont analysés en spectrométrie de masse. La masse moléculaire exacte de ces peptides est déterminée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (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, 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 (en cas d'électrophorèse bidimensionnelle) de la protéine sont également utilisées lors de l'interrogation des banques de données. Si nécessaire, des informations partielles de la séquence des peptides peuvent être obtenues par spectrométrie de masse en tandem dite MS/MS après fragmentation des ions parents.

Dans notre étude, l'analyse protéomique des protéines-O-GlcNAc du muscle squelettique a nécessité la purification préalable de ces protéines. Deux approches ont été utilisées : d'une part, une chromatographie d'affinité sur colonne de lectine, et d'autre part une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre le motif O-GlcNAc.

III – Identification des protéines-O-GlcNAc isolées du gastrocnemius.

A – Nature de la glycosylation des glycoprotéines purifiées sur colonne de WGA.

La purification des protéines-O-GlcNAc a été réalisée à partir du gastrocnemius, un muscle fléchisseur de la cheville choisi en raison de sa taille importante ; ce muscle présente également l'avantage d'être constitué à la fois de fibres lentes et de fibres rapides.

A partir du pool protéique total du gastrocnemius, les protéines-O-GlcNAc ont été purifiées sur colonne de WGA (Wheat Germ Agglutinin). La WGA est une lectine de masse moléculaire 36 000 daltons, isolée du germe de blé *Triticum vulgare* ; elle reconnaît à la fois

les motifs N-acétylglucosamine terminaux et les acides N-acétylneuraminiques (acides sialiques) retrouvés au niveau des glycoprotéines et des glycolipides. Comme elle présente cette double spécificité vis-à-vis des résidus de N-acétylglucosamine *N*- et *O*-liés, l'utilisation de la WGA nécessite une *N*-déglycosylation préalable. Cette réaction est réalisée par la peptide-N-glycosidase F, communément appelée PNGase F.

Afin de tester la spécificité de la purification des protéines-O-GlcNAc sur colonne de WGA immobilisée sur billes d'agarose, différents contrôles ont été réalisés. Comme le montre la figure 37-A, un grand nombre de glycoprotéines sont retenues sur colonne de WGA ; la majorité d'entre elles présentent une masse moléculaire supérieure à 45 000 daltons. Ces protéines ont été révélées par la WGA couplée à la peroxydase, avant (figure 37-B) ou après (figure 37-C) désialylation chimique à l'acide formique. Le même profil est obtenu avant ou après désialylation, ce qui suggère que les protéines retenues sur colonne de WGA portent des résidus de N-acétylglucosamine et non pas des acides sialiques.

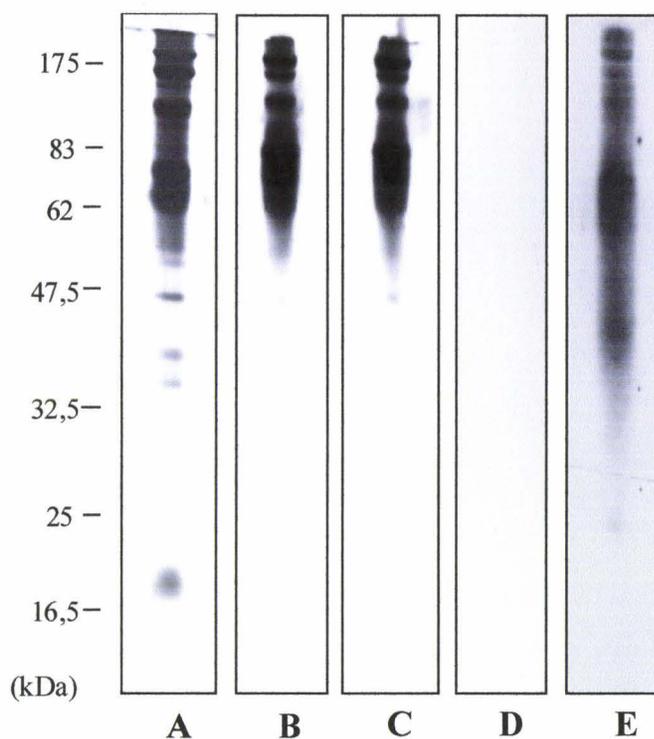


Figure 37 : *Electrophorèse monodimensionnelle 10-20% des glycoprotéines musculaires purifiées sur colonne de WGA. (A) Coloration au nitrate d'argent ; (B) Révélation WGA-peroxydase avant désialylation chimique ; (C) Révélation WGA-peroxydase après désialylation chimique ; (D) Révélation WGA-peroxydase en présence de 0,2 M GlcNAc ; (E) Révélation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc RL-2.*

Première partie – Identification des protéines-O-GlcNAc du muscle squelettique

Aucun signal n'a été détecté lorsque la WGA est incubée en présence de 0,2 M de N-acétylglucosamine (figure 37-D), ce qui suggère que les signaux détectés par la WGA correspondent bien à des résidus de N-acétylglucosamine. Enfin, le profil protéique obtenu après révélation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc (figure 37-E) est identique au profil des protéines purifiées sur colonne de WGA colorées au nitrate d'argent (figure 37-A) ; le profil est également similaire au profil des protéines révélées par Western blot par la WGA couplée à la peroxydase (figure 37-B/C), notamment pour les masses moléculaires les plus hautes.

Toutes ces données nous confirment bien que les protéines du gastrocnemius purifiées sur colonne de WGA sont modifiées par la O-N-acétylglucosamine. Ces protéines seront séparées par électrophorèse bidimensionnelle en vue de leur identification par spectrométrie de masse.

B – Analyse protéomique des protéines-O-GlcNAc du muscle squelettique.

1 – Séparation des protéines-O-GlcNAc par électrophorèse bidimensionnelle.

Les protéines-O-GlcNAc purifiées à partir du gastrocnemius sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle. La première dimension a permis une séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique, sur une gamme de pH de 3 à 10 ; la seconde dimension a permis une séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire sur un gel SDS-PAGE à 10%. Les gels obtenus après coloration au nitrate d'argent ou après Western blot sont représentés figure 38.

La figure 38-A représente le pool protéique total du gastrocnemius, tandis que le gel figure 38-B représente le pool de protéines-O-GlcNAc purifiées sur colonne de WGA, ces deux gels étant colorés à l'argent. Il existe donc un grand nombre de protéines modifiées par ce type de glycosylation, comme le montre le nombre très important de spots protéiques sur la figure 38-B ; ceci implique sans nul doute une part importante de cette modification post-traductionnelle dans la fonctionnalité du muscle squelettique. Par ailleurs, la différence entre les profils protéiques du gel contrôle (figure 38-A) et le gel des protéines-O-GlcNAc (figure 38-B) suggère qu'un grand nombre de protéines portant ce motif O-GlcNAc sont peu exprimées au sein du tissu squelettique. En effet, des spots peu intenses voire absents du profil protéique du contrôle (figure 38-A) sont fortement augmentés après enrichissement sur colonne de WGA (figure 38-B).

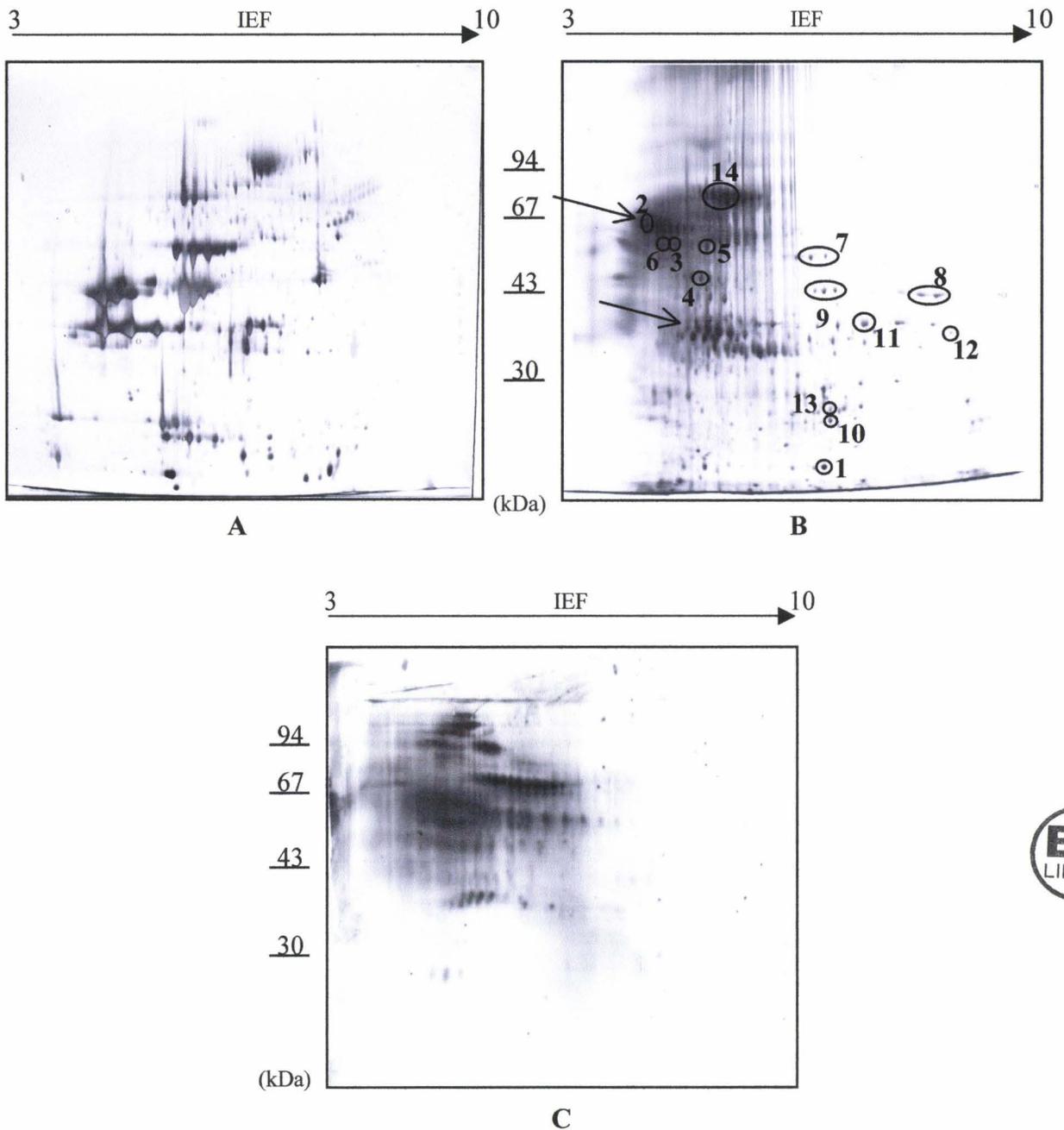


Figure 38 : Electrophorèses bidimensionnelles d'un pool total de protéines du gastrocnemius (300 µg de protéines déposées (en A)) et de protéines-O-GlcNAc purifiées sur colonne de WGA (B : coloration au nitrate d'argent ; C : révélation à la WGA-peroxydase après désialylation chimique). Les protéines identifiées sont numérotées de 1 à 14 sur le gel B.

L'analyse comparative de la figure 38-B (coloration des protéines-O-GlcNAc au nitrate d'argent) et la figure 38-C (Western blot des protéines-O-GlcNAc révélées par la WGA couplée à la peroxydase après désialylation chimique) nous confirme encore une fois

que les protéines purifiées sur colonne de WGA correspondent exclusivement à des protéines-O-GlcNAc.

Il est à noter que certains spots protéiques révélés au nitrate d'argent (figure 38-B) ne sont pas révélés par Western blot ; ces spots peuvent correspondre à des protéines exprimées en faible quantité, et donc non détectées par chimiluminescence, ou alors à des protéines présentant peu de sites modifiés par la O-GlcNAc, et donc mal reconnus par la lectine.

2 – Identification des protéines-O-GlcNAc du gastrocnemius par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Les spots les mieux résolus sont excisés du gel et soumis à une hydrolyse trypsique. Les peptides issus de cette protéolyse sont analysés en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF ; une empreinte peptidique est obtenue pour chaque spot protéique. Chaque protéine possède une empreinte peptidique qui lui est propre ; ceci est illustré par la figure 39, représentant les spectres MALDI-TOF de deux protéines identifiées dans ce travail : la créatine kinase (figure 39-A) et la β -énolase (figure 39-B).

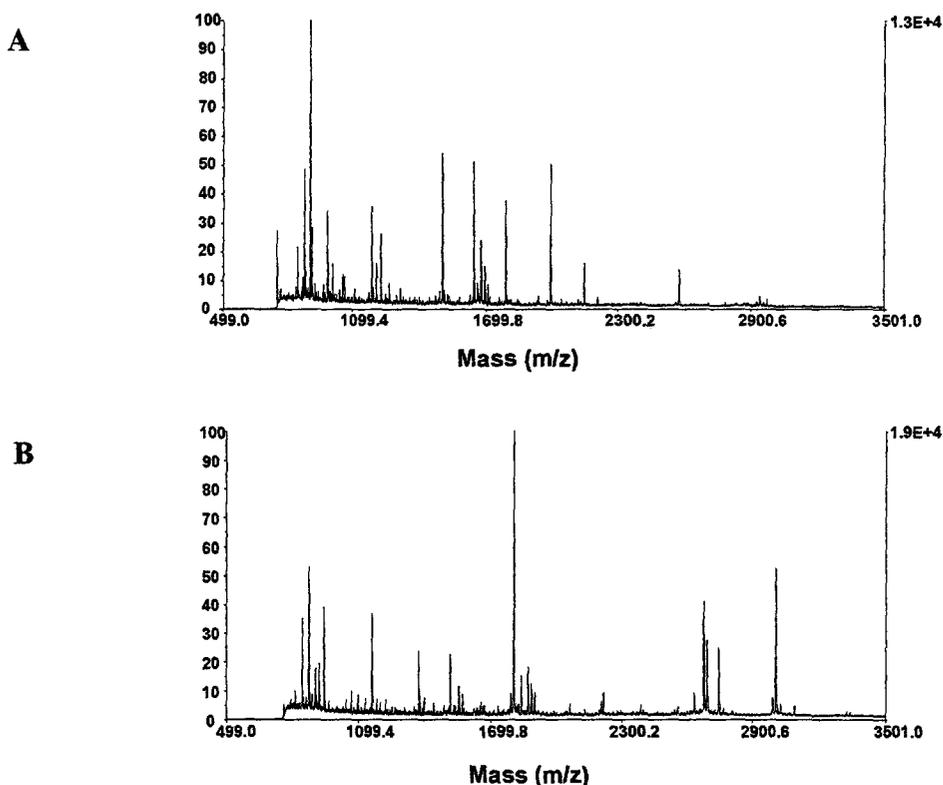


Figure 39 : Empreintes peptidiques de deux protéines-O-GlcNAc. (A) : créatine kinase ; (B) : β -énolase.

Différents paramètres sont utilisés pour l'interrogation des banques de données, notamment la masse moléculaire de la protéine, son point isoélectrique, ainsi que la masse exacte des peptides de l'empreinte peptidique, avec une erreur de masse admise de 0,05 Da. Il existe souvent de nombreuses protéines candidates ; le « score » obtenu, le nombre de peptides expérimentaux coïncidant avec les peptides théoriques ainsi que le pourcentage de séquence recouverte par les peptides expérimentaux sont différents paramètres utilisés pour déterminer avec exactitude l'identité de la protéine correspondant à un spot donné. Le tableau VII regroupe l'ensemble des protéines identifiées dans ce travail ; sont également inscrits dans ce tableau la masse moléculaire et le point isoélectrique de la protéine, le score obtenu dans les banques de données protéiques Swiss-Prot et NCBI, le nombre de peptides expérimentaux appartenant à la protéine ainsi que le pourcentage de séquence recouverte. Les scores inscrits dans ce tableau correspondent aux résultats obtenus dans le moteur de recherche MS-Fit ; il faut néanmoins préciser que l'identification de la protéine est confirmée par une recherche sur le moteur de recherche ProFound.

Les protéines-O-GlcNAc ainsi identifiées dans le gastrocnemius peuvent être réparties en trois classes. La première d'entre elles correspond à des protéines impliquées dans la transduction du signal, à des protéines impliquées dans la translocation cytosol-noyau, ainsi qu'à des protéines structurales. Il s'agit de l' α B-cristalline (spot 1 sur le figure 38-B), la sous-unité régulatrice p85 de la phospho-inositide 3-kinase (spot 2), la protéine phosphatase 2A (spot 3), la MAP kinase kinase kinase 8 (spot 4), l'homologue de la protéine de translocation 4 de la levure (spot 5) et de l'inhibiteur III de la sérine protéase (spot 6). Sept protéines constituent la seconde classe protéique, correspondant à des enzymes impliquées dans la glycolyse et le métabolisme énergétique, telles que la β -énolase (spot 7), la fructose bisphosphatase aldolase (spot 8), la créatine kinase M (spot 9), la triose phosphate isomérase (spot 10), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (spot 11), la malate déshydrogénase mitochondriale (spot 12) et l'anhydrase carbonique III (spot 13). Enfin, la troisième classe correspond à des protéines impliquées dans la machinerie contractile du muscle squelettique, en particulier la chaîne lourde de myosine MHC (spot 14).

Il est à noter que certaines de ces protéines-O-GlcNAc sont présentes sous différentes isoformes (figure 40).

Tableau VII : Protéines-O-GlcNAc protéines identifiées dans le gastrocnemius (après purification sur colonne de WGA, séparation par électrophorèse bidimensionnelle et analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF).

Nom	Mw (Da)	pI	Score (NCBI)	Score (Swiss-Prot)	Nombre de peptides	Séquence recouverte (%)
<u>Protéines impliquées dans la transduction du signal, dans la translocation cytosol-noyau, et protéines structurales</u>						
αB-cristalline	19 958	6.8	1.66e+5	3.23e+5	14	66
Phosphoinositide-3-kinase, p85	85532	5.9	1.24e+4	9.16e+3	8	13
Protéine phosphatase 2A	45555	5.4	2.01e+4	2.70e+4	16	43
MAP kinase kinase kinase 8	52808	5.7	1.09e+5	1.05e+5	9	16
Homologue de la protéine de translocation 4 (levure)	68 057	6.0	1.18e+5	/	10	15
Inhibiteur III de la sérine protéase	45555	5.3	2.54e+6	8.83e+6	16	43
<u>Enzymes impliquées dans la glycolyse et le métabolisme énergétique</u>						
β-éno­lase	46 961	7.6	9.61e+3	5.09e+3	15	24
			3.00e+8	1.41e+8	24	48
Fructose bisphosphatase aldolase	39 352	8.3	2.55e+10	3.01e+9	19	65
			2.74e+10	4.07e+9	13	50
Créatine kinase	43 019	6.6	3.05e+9	1.258e+9	26	60
			1.42e+9	5.55e+8	30	70
			9.98e+5	7.22e+5	18	53
Triose phosphate isomérase	26 921	6.4	6.35e+3	2.23e+4	12	42
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase	35 836	8.4	2.78e+12	5.39e+11	21	47
Malate déshydrogenase mitochondriale	35 656	8.9	6.23e+5	1.962e+5	11	22
Anhydrase carbonique III	29 401	6.9	1.14e+6	2.99e+6	13	53
<u>Protéines impliquées dans la machinerie contractile du muscle squelettique</u>						
Chaîne lourde de myosine	103 583	5.3	2.72e+4	/	14	14

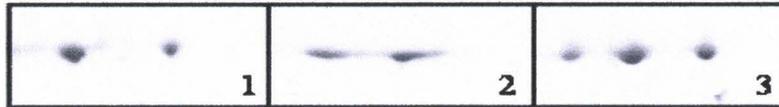


Figure 40 : Isoformes de protéines-O-GlcNAc identifiées sur l'électrophorèse bidimensionnelle. (1) β-énolase ; (2) : fructose-bisphosphatase aldolase ; (3) : créatine kinase.

En effet, une même protéine peut correspondre à deux voire trois spots, ces spots présentant un shift au niveau de leur point isoélectrique. Il est donc probable que ces isoformes correspondent à des isoformes de phosphorylation, chacune de ces isoformes pouvant également être modifiée par la O-GlcNAc. Il s'agit en particulier de la β-énolase (en 1 sur la figure 40), de la fructose-bisphosphatase aldolase (en 2) ou de la créatine kinase (en 3), correspondant respectivement aux spots 7, 8 et 9 sur la figure 38-B.

Les autres spots excisés n'ont pas été identifiés avec succès ; cet échec peut notamment être dû à la faible expression de ces protéines. D'autre part, il faut mentionner que les spots présents dans les deux larges bandes indiquées par des flèches au niveau de la figure 38-B n'ont pas été attribués à des protéines ; il semble que ces bandes correspondent à un mélange trop complexe de protéines, non résolu par l'électrophorèse bidimensionnelle.

Enfin, il est intéressant de noter la O-N-acétylglucosaminylation de la chaîne lourde de myosine (MHC, myosin heavy chain), au rôle clé dans la contraction musculaire. Il existe différentes isoformes de MHC : une isoforme lente (MHCI), et des isoformes rapides (MHCIIA, MHCIIB et MHCIID(X), comme décrit dans les généralités (figure 41-A).

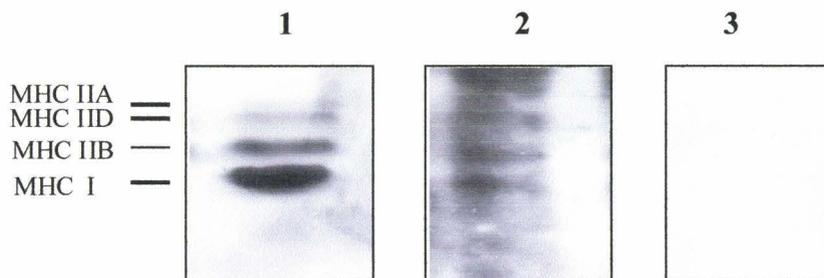


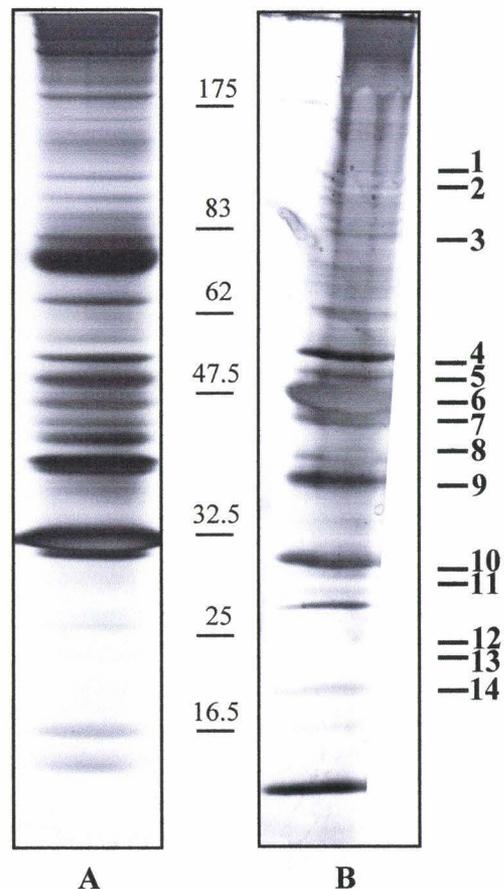
Figure 41 : Analyse de la modification par O-GlcNAc des isoformes de chaînes lourdes de myosine. Les différentes isoformes sont détectées soit par coloration au nitrate d'argent (A), ou par révélation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc en l'absence (B) ou en présence (C) de 0,2 M de GlcNAc.

Il s'avère que chacune des isoformes de MHC sont modifiées par la O-GlcNAc, comme le montre le Western blot des isoformes de MHC révélées par l'anticorps anti-O-GlcNAc RL-2 (figure 41-B). L'absence de signal détecté figure 41-C indique que le signal obtenu par révélation avec l'anti-O-GlcNAc correspond bien à la présence de résidus de N-acétylglucosamine sur les MHC, et non à des signaux aspécifiques.

IV – Identification des protéines-O-GlcNAc isolées du soleus.

Nous avons également envisagé de purifier les protéines-O-GlcNAc du muscle squelettique soleus selon une autre technique, à savoir une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc RL-2. Cette stratégie n'avait pas été utilisée en première approche du fait de la sensibilité plus faible de cette méthodologie en comparaison de la purification des protéines-O-GlcNAc par chromatographie d'affinité sur colonne de WGA. Les protéines purifiées par immunoprécipitation sont séparées par électrophorèse monodimensionnelle afin de remédier à ce problème de sensibilité. Le profil protéique des protéines-O-GlcNAc purifiées du soleus par l'anticorps anti-O-GlcNAc RL-2 obtenu après coloration du gel au nitrate d'argent est représenté figure 42.

Figure 42 : *Electrophorèse monodimensionnelle de protéines-O-GlcNAc purifiées par immunoprécipitation à partir du soleus. Coloration au nitrate d'argent. (A) Pool protéique total ; (B) protéines-O-GlcNAc.*



De nombreuses protéines ont été purifiées selon cette technique, et quatorze de ces protéines ont été identifiées par analyse protéomique. Le tableau VIII regroupe les protéines identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, tandis que le tableau IX regroupe les protéines dont l'identité a été confirmée par spectrométrie de masse en tandem. Dans le cas de la spectrométrie de masse en tandem, des ions parents sont sélectionnés pour le séquençage MS-MS afin d'être fragmentés. La figure 43 représente les séquences obtenues pour certains peptides appartenant à l'empreinte peptidique de la chaîne bêta de l'ATP synthase. Ainsi, le peptide de masse 1262,6685 correspond au peptide ayant comme séquence en acides aminés (R)IIAMDGTEGLVR(G) et le peptide de masse 1088,6052 à la séquence (K)VVDLLAPYAK(G). Ces séquences correspondent bien à l'ATP synthase (chaîne bêta).

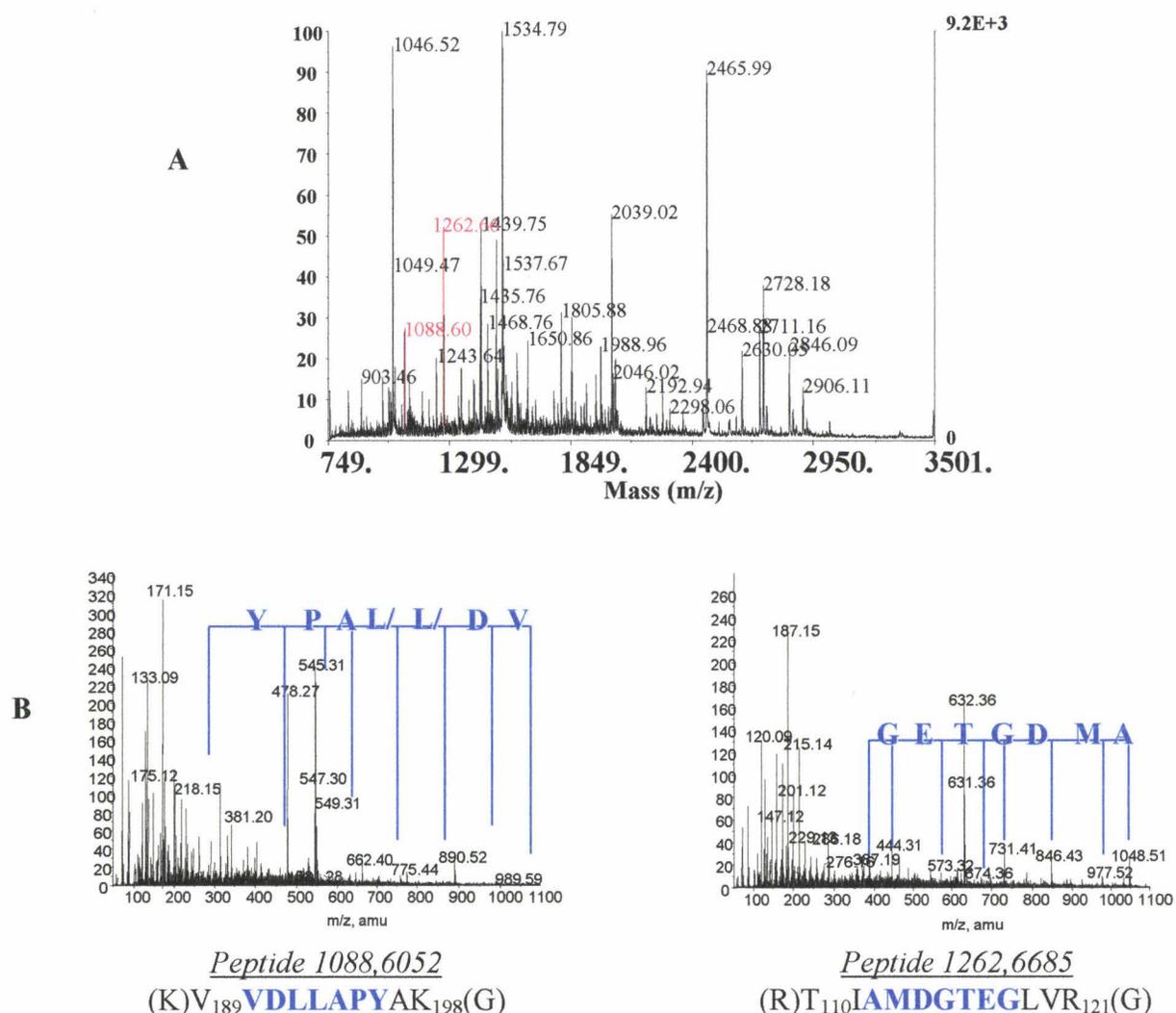


Figure 43 : (A) Spectre MALDI-TOF de l'ATP synthase. (B) Spectres de fragmentation des peptides de masse 1088,6052 et 1262,6685 et séquences correspondantes.

Tableau VIII : Protéines-O-GlcNAc identifiées dans le soleus (après immunoprécipitation, séparation par électrophorèse mono-dimensionnelle et analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Le symbole (*) indique les protéines dont l'identité a été confirmée par MS-MS.

Nom de la protéine	N°de bande	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique	Nombre de peptides	% de séquence recouverte
<u>Protéines contractiles</u>					
Actine *	6	42 051	5.2	13	54
<u>Protéines structurales du sarcomère</u>					
Actinine *	1	103 014	5.3	19	22
αB-cristalline	14	19 958	6.8	9	55
<u>Enzymes glycolytiques / glycogénolytiques</u>					
Glycogène phosphorylase	2	97 274	6.9	14	22
β-énolase	5	46 961	7.6	10	25
Fructose biphosphatase aldolase	8	39 352	8.3	12	43
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase*	9	35 828	8.1	12	42
Lactate déshydrogenase*	9	36 613	5.7	8	28
Triose phosphate isomérase	11	26 921	6.4	4	20
<u>Enzymes énergétiques</u>					
Créatine kinase	7	43 019	6.6	12	30
Adénylate kinase (myokinase) *	12	21 602	7.7	8	41
ATP synthase, beta chain*	4	56 354	5.2	14	37
<u>Autres</u>					
Aconitase mitochondriale	3	85 475	7.9	18	30
Malate déshydrogénase cytosolique *	9	36 483	8.1	9	29
Anhydrase carbonique III	10	29 432	6.8	13	66
Phosphatidyl ethanolamine binding protein	13	20 802	5.5	9	68

Tableau IX : Séquences peptidiques obtenues par fragmentation MS-MS de peptides, permettant de confirmer l'identité de la protéine après analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Nom de la protéine	Bande	Ion m/z	Peptide	Séquence
Actine	6	1130.538	199-208	(R)GYSFVTTAER(E)
		1198.6909	31-41	(R)AVFPSIVGRPR(H)
		1790.759	241-256	(K)SYELPDGQVITIGNER(F)
Actinine	1	1537.7762	134-147	(R)FAIQDISVEETSAK(E)
		1521.7494	61-73	(K)AGTQIENIEEDFR(N)
		1392.6742	49-59	(K)TFTAWCNSHLR(K)
		1199.6401	22-31	(R)DLLLDPAWEK(Q)
Adénylate kinase	13	1130.6996	10-21	(K)IIFVVGPGSGK(G)
		1269.7333	156-166	(K)ATEPVISFYDK(R)
		1425.8576	156-166	(K)ATEPVISFYDK(R)
		1539.9151	84-97	(K)VDSSNGFLIDGYPR(E)
Lactate déshydrogenase	9	1666.8998	8-23	(K)LIAPVADDETA VPNNK(I)
		1253.6718	234-244	(K)MVDSDAYEVIK(L)
Malate déshydrogenase	9	1178.6440	221-230	(K)GEFITTVQQR(G)
		1393.7745	299-310	(K)FVEGLPINDFSR(E)
		1026.4879	150-157	(K)ENFSCLTR(L)
GAPDH	9	1369.7842	199-213	(R)GAAQNIIPASTGAAK(A)
		1556.8741	233-246	(R)VPTPNCSVVDLCR(L)
		1779.8653	308-321	(K)LISWYDNEYGYSNR(V)
ATP synthase	4	1088.6052	189-198	(K)VVDLLAPYAK(G)
		1262.6685	110-121	(R)TIAMDGTEGLVR(G)
		1435.7680	311-324	(R)FTQAGSEVSALLGR(I)

Les protéines-O-GlcNAc ainsi identifiées ont là encore été réparties en différentes classes, telles que les protéines contractiles, les protéines impliquées dans la structure du sarcomère, des enzymes glycolytiques et glycogénolytiques, des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique du muscle squelettique, et enfin une classe de protéines regroupant des protéines n'ayant pas été classées parmi les groupes précédents. Certaines de ces protéines ont déjà été identifiées dans la première partie de notre travail (purification des protéines-O-GlcNAc dans le gastrocnemius) : il s'agit en particulier de l' α B-cristalline (bande 14 sur le figure 42), de la fructose bisphosphatase aldolase (bande 8), de la triose phosphate isomérase (bande 11), de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (bande 9), de la β -énolase (bande 5) et enfin de l'anhydrase carbonique III (bande 10).

Outre les MHC décrites précédemment comme étant *O*-GlcNAc, nous avons identifié une nouvelle protéine contractile portant ce type de modification post-traductionnelle. Il s'agit en particulier d'une autre protéine clé de la contraction musculaire : l'actine (bande 6 sur la figure 42). Une protéine structurale, l' α -actinine (bande 1), qui joue un rôle important au niveau de la stabilisation du sarcomère, est également *O*-GlcNAc.

Nous avons également identifié d'autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique du muscle squelettique comme modifiées par la *O*-GlcNAc, telles que l'enzyme de glycolyse anaérobie lactate déshydrogénase (bande 9), l'enzyme glycogénolytique glycogène phosphorylase (bande 2), mais encore des enzymes impliquées dans la synthèse ou la régénération de l'ATP, respectivement la sous-unité bêta de l'ATP synthase (bande 4) et la myokinase ou adénylate kinase (bande 12).

V – Discussion.

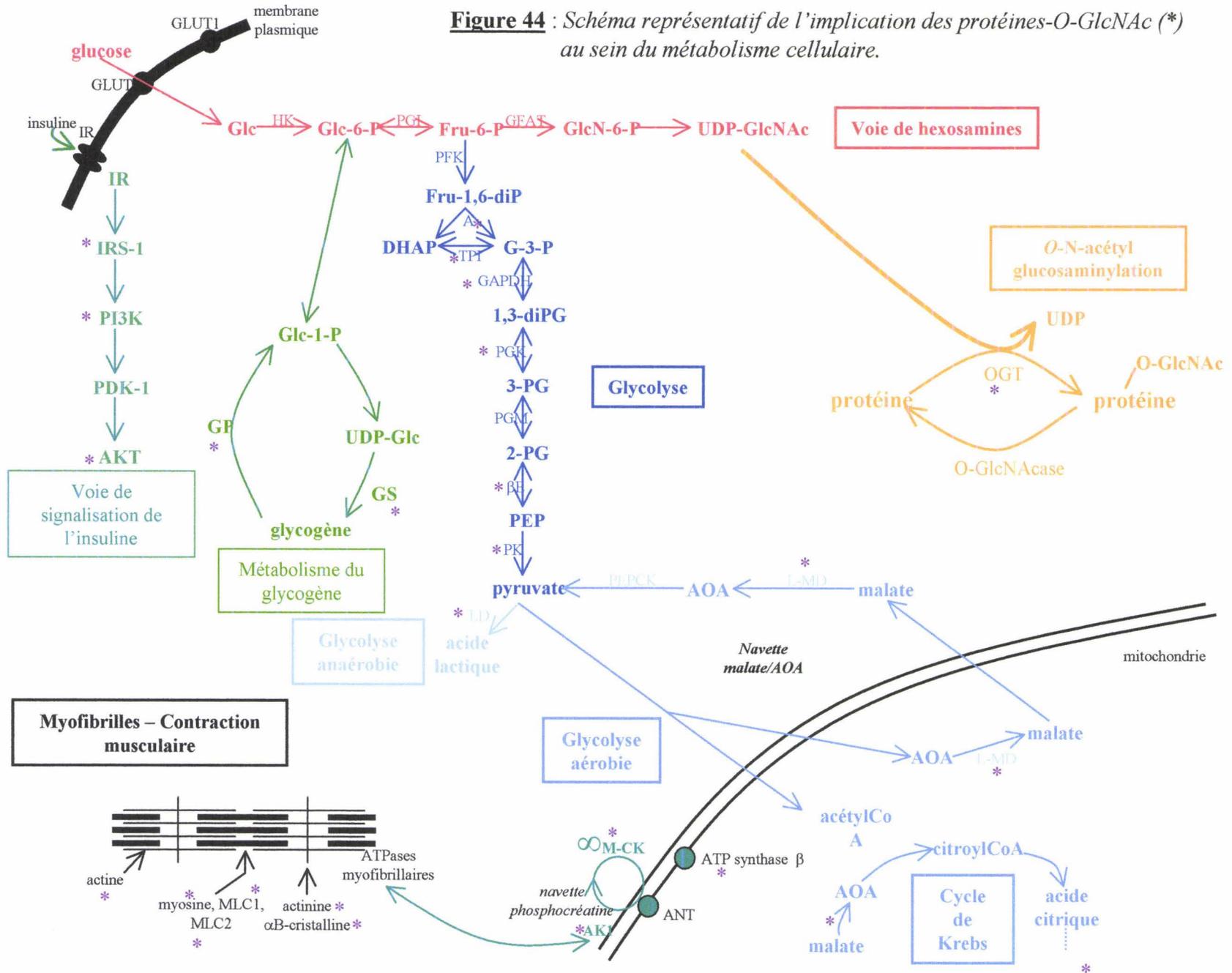
Nous avons identifié un certain nombre de protéines modifiées par la *O*-GlcNAc au sein du muscle squelettique. Ces protéines appartiennent à différentes voies métaboliques et processus de la cellule musculaire, telles que la glycolyse aérobie et anaérobie, la voie de signalisation de l'insuline, la contraction musculaire...

La figure 44 met en évidence la présence de protéines-*O*-GlcNAc au sein de différents processus cellulaires. Comme le montre la complexité de ce schéma, ces protéines-*O*-GlcNAc sont impliquées dans un grand nombre de processus fonctionnels du muscle squelettique.

A – Enzymes impliquées dans la synthèse et la régénération de l'ATP intracellulaire.

Nous avons identifié au cours de notre travail deux protéines impliquées dans la régénération rapide de l'ATP consécutive à un exercice musculaire.

Outre la fonction possible de la *O*-GlcNAc dans la régulation de l'activité de la créatine kinase (augmentation ou diminution de son activité), il est légitime de supposer un rôle possible de cette modification post-traductionnelle dans la formation du dimère ou de l'octamère de créatine kinase. En effet, il est aujourd'hui admis que la *O*-GlcNAc intervient dans la formation de complexes protéiques ou multienzymatiques. Nous pouvons notamment



citer le cas de l'ARN polymérase, avec un rôle de la *O*-GlcNAc dans la modulation de l'activité de la protéine (Kelly et coll., 1993 ; Comer & Hart, 2001), ainsi que le cas des neurofilaments, avec un rôle de la *O*-GlcNAc dans la polymérisation de protéines (Dong et coll., 1993 ; Dong et coll., 1996). Il est à noter que nous avons montré dans ce travail que la créatine kinase est présente sous trois formes pouvant correspondre à des isoformes de phosphorylation (puisque les trois spots identifiés comme créatine kinase ne diffèrent qu'en terme de point isoélectrique), chacune de ces isoformes étant glycosylée.

La *O*-GlcNAc pourrait également jouer un rôle clé dans la formation de complexes multienzymatiques impliquant l'adénylate kinase ou myokinase. En effet, il a été démontré une interaction entre l'adénylate kinase et les enzymes glycolytiques, en particulier avec la phosphofructokinase (Gerlach & Hofer, 1986). Par ailleurs, l'adénylate kinase est impliquée dans la communication entre les ATPases myofibrillaires et la mitochondrie (Savabi, 1994 ; Dzeja et coll., 1998), le transport de l'ADP et de l'ATP entre la mitochondrie et le cytosol étant réalisé par l'intermédiaire du complexe adénosine nucléotide translocase/VDAC/créatine kinase octamérique que nous avons décrit dans nos généralités. Certains auteurs (Janssen et coll., 2003) suggèrent d'ailleurs une régulation post-traductionnelle dans la formation de ce complexe ; il est à ce niveau très tentant de penser que la *O*-GlcNAc puisse assurer cette fonction.

B – Métabolisme énergétique.

1 – Glycolyse.

La *O*-GlcNAc semblerait pouvoir jouer un rôle clé dans la glycolyse, notamment dans la régulation de l'activité enzymatique des protéines effectrices de la glycolyse. Ainsi, nous avons vu que la fructose bisphosphatase aldolase (FBPase), modifiée par la *O*-GlcNAc, est présente sous deux formes différant en terme de pI. La balance phosphorylation/*O*-N-acétylglucosaminylation pourrait donc jouer un rôle prépondérant à ce niveau. Cette modification des enzymes glycolytiques par la *O*-GlcNAc pourrait ajouter un niveau supplémentaire dans la régulation de la voie glycolytique en fonction de l'état nutritionnel de la cellule. En effet, le taux de *O*-GlcNAc dépend du taux d'UDP-GlcNAc, synthétisé par la voie de biosynthèse des hexosamines et dépendant du taux de glucose entrant dans la cellule.

Par ailleurs, la *O*-GlcNAc pourrait également jouer un rôle dans la formation du complexe glycolytique avec le réticulum sarcoplasmique ou avec le filament fin. En effet, il existe une interaction entre la phosphoglucoisomérase, la phosphofructokinase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la pyruvate kinase et l'aldolase avec les filaments fins (Clarke & Masters, 1975 ; Méjean et coll., 1989) ; or, les trois dernières enzymes citées précédemment sont modifiées par la *O*-GlcNAc, qui pourrait une fois de plus jouer un rôle dans les interactions protéine-protéine.

Enfin, nous avons également montré que la β -énolase est également présente sous deux formes en terme de point isoélectrique. Il semblerait que bien que la β -énolase puisse être phosphorylée *in vitro* que les isoformes résultent de la présence ou de l'absence d'une lysine carboxy-terminale (Merkulova et coll., 1997).

2 – Cycle de Krebs.

Nous avons pour la première fois identifié certaines protéines mitochondriales comme modifiées par la *O*-GlcNAc. Il nous a semblé au départ surprenant de d'identifier des protéines mitochondriales modifiées par la *O*-GlcNAc. Cependant, il a récemment été démontré que la *O*-GlcNAc transférase est exprimée au sein de la mitochondrie (Love et coll., 2003 ; Hanover et coll., 2003), ce qui suggère que des protéines mitochondriales puissent être modifiées par la *O*-GlcNAc.

Au niveau du cycle de Krebs, la *O*-GlcNAc pourrait jouer un rôle important au niveau de la régénération du cycle, puisque les deux enzymes impliquées dans la navette malate-oxaloacétate (malate déshydrogénases cytosolique et mitochondriale) sont touchées par cette modification post-traductionnelle. La *O*-GlcNAc pourrait donc jouer un rôle régulateur de cette navette, par exemple en fonction du taux de glucose qui entrerait dans la cellule.

C – Métabolisme du glycogène.

La *O*-GlcNAc a été démontrée comme jouant un rôle dans le métabolisme du glycogène, en particulier par les différentes études menées sur la résistance à l'insuline. De nombreuses protéines de la voie de signalisation de l'insuline ont été démontrées comme étant *O*-GlcNAc, en particulier la protéine IRS-1, Akt, mais également l'enzyme permettant la synthèse de glycogène : la glycogène synthase, ainsi que la glycogène synthase kinase qui

régule l'activité de la glycogène synthase (Patti et coll., 1999 ; Lubas & Hanover, 2000 ; Vosseler et coll., 2002a ; Federici et coll., 2002 ; Parker et coll., 2003). La glycosylation de la glycogène synthase inhibe l'enzyme de manière analogue à la phosphorylation, et c'est seulement après élimination du motif *O*-GlcNAc que l'enzyme peut être pleinement activée par la protéine phosphatase 1. Nous montrons pour la première fois dans cette étude que la glycogène phosphorylase, responsable de l'hydrolyse du glycogène, porte également un résidu de N-acétylglucosamine. La *O*-GlcNAc pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme du glycogène, par la régulation de l'activité de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase.

D – Protéines contractiles.

Nous avons identifié au cours de ce travail que des protéines clé de la contraction musculaire sont *O*-GlcNAc : la chaîne lourde de myosine et l'actine.

Nous aborderons la fonction de la *O*-GlcNAc dans le processus contractile dans la troisième partie de ce travail, intitulée « Implication de la *O*-GlcNAc dans les propriétés contractiles du muscle squelettique ».

E – Conclusion : la O-GlcNAc au sein du muscle squelettique.

1 – Source d'énergie du muscle squelettique.

Nous avons montré l'implication de la *O*-GlcNAc dans un grand nombre de processus fonctionnels du muscle squelettique, tels que le métabolisme énergétique. Il est très intéressant de noter que la *O*-GlcNAc est présente dans chacun des moyens de régénération de l'ATP, permettant le maintien de la contraction musculaire du muscle strié. En effet, lorsque le muscle se contracte, il utilise une quantité importante d'ATP. Ce dernier peut provenir de trois filières (décrites dans nos généralités) :

- la filière anaérobie alactique, permettant une régénération rapide de l'ATP. C'est le système de la phosphocréatine, permettant le maintien d'une contraction de 15 à 30 secondes ;
- la filière anaérobie lactique, intervenant dans les contractions de durée plus longue ;

- la filière aérobie, produisant une grande quantité d'ATP et permettant le maintien d'exercices de longue durée.

Le muscle squelettique est un tissu insulino-dépendant, dont le métabolisme dépend fortement du taux de glucose sanguin et du glucose cellulaire. La majorité du glycogène de l'organisme est d'ailleurs stocké au niveau du muscle strié. La O-GlcNAc, senseur nutritionnel du taux glucose, pourrait donc participer aux voies de régulation métabolique du muscle, notamment en exerçant une régulation métabolique en fonction des besoins énergétiques du muscle.

2 – Marqueurs d'atrophie musculaire.

Parmi toutes les protéines-O-GlcNAc identifiées dans notre travail, il faut noter la présence de six marqueurs impliqués dans la plasticité musculaire et dans l'adaptation du phénotype du muscle à de nouvelles conditions physiologiques. Il s'agit en particulier des chaînes lourdes de myosine, de la créatine kinase, de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, de l' α B-cristalline, de l'anhydrase carbonique III et de la β -énolase (Carter et coll., 1988 ; Atomi et coll., 1991 ; Cros et coll., 1999 ; Nozais et coll., 1999).

Ces résultats pourraient laisser penser que la glycosylation pourrait jouer un rôle au cours de l'atrophie musculaire. De plus, cette glycosylation concerne de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme énergétique du muscle. Dans la mesure où la transition d'un métabolisme oxydatif en un métabolisme glycolytique a été rapporté au cours de l'atrophie fonctionnelle, nous avons décidé d'étudier les variations de la O-GlcNAc au cours de l'atrophie induite par le modèle d'hypodynamie-hypokinésie, dont les résultats seront détaillés dans la seconde partie de notre travail, intitulée « Variations du taux de O-GlcNAc au cours de l'atrophie induite par hypodynamie-hypokinésie ».

Deuxième partie

*Variations du taux de O-
GlcNAc au cours de
l'atrophie induite par
hypodynamie-hypokinésie*

I – Problématique.

Nous avons montré grâce à l'identification des protéines-*O*-GlcNAc dans le muscle squelettique que ce type de modification post-traductionnelle pourrait intervenir au niveau de nombreux processus de la vie de la cellule musculaire. C'est notamment le cas du métabolisme énergétique, avec les voies de régénération de l'ATP (anaérobie alactique, anaérobie lactique et aérobie), ainsi que dans la contraction musculaire, avec notamment la modification de la chaîne lourde de myosine et de l'actine.

Bon nombre de processus musculaires sont modifiés après un épisode de microgravité réelle ou simulée dans le muscle lent, tels que la sensibilité calcique, la vitesse de raccourcissement des fibres ou encore le métabolisme énergétique. Le muscle soleus, au métabolisme initialement oxydatif, se transforme ainsi en un muscle au métabolisme prédominant glycolytique. D'autre part, l'atrophie observée dans le muscle lent s'accompagne de l'expression d'isoformes protéiques dites rapides dans le muscle lent, en particulier les chaînes lourdes de myosine. Or, nous avons également démontré par l'identification des protéines-*O*-GlcNAc du muscle squelettique que pas moins de six marqueurs précoces de l'atrophie musculaire sont modifiés par la *O*-GlcNAc, ce qui pourrait donc impliquer la *O*-N-acétylglucosaminylation dans le phénomène d'atrophie induite par l'hypodynamie-hypokinésie.

Nous avons donc entrepris d'étudier les variations du taux global de *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique après un épisode de 14 et de 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie, et ce à la fois dans le soleus, muscle lent touché par l'atrophie de non-utilisation, et dans l'EDL ou extensor digitorum longus, muscle rapide, peu affecté après hypodynamie-hypokinésie. Cette détermination du taux global de *O*-GlcNAc s'est accompagnée de l'étude des variations des activités des enzymes de la *O*-GlcNAc (*O*-GlcNAc transférase et *O*-GlcNAcase) ainsi que de l'expression de leurs transcrits. Nous avons également entrepris de déterminer les variations du taux de phosphorylation.

Par ailleurs, de nombreux travaux réalisés jusqu'alors dénotent une relation étroite entre le taux global de *O*-GlcNAc et le taux d'expression des protéines de choc thermique, ainsi qu'une relation avec les systèmes de dégradation cellulaire, ceux-ci étant impliqués dans le phénomène d'atrophie musculaire. Nous avons donc entrepris d'étudier parallèlement aux variations du taux de *O*-GlcNAc les variations d'expression de la protéine de choc thermique HSP70.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication soumise dans *Journal of Applied Physiology* (Cieniewski-Bernard C, Mounier Y, Michalski JC, and Bastide B. (2005) O-GlcNAc level variations are associated with the development of atrophy in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (en révision mineure)).

II – Variations du taux de O-GlcNAc.

A – Principe.

Les variations du taux de O-GlcNAc ont été déterminées après deux durées d'hypodynamie-hypokinésie : 14 jours (HH₁₄) et 28 jours (HH₂₈). Il est en effet admis que la totalité des modifications du muscle lent, tant au niveau du développement de l'atrophie que du changement phénotypique, sont obtenues après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie, alors que les changements phénotypiques ne sont pas complets après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie. Ces variations sont déterminées par rapport à un contrôle (C), c'est-à-dire un muscle isolé d'un animal non soumis à l'hypodynamie-hypokinésie.

B – Variations du taux global de O-GlcNAc.

1 – Atrophie du muscle lent.

Les variations de masse des muscles soleus et EDL, permettant de mettre en évidence le degré d'atrophie de ces deux muscles après hypodynamie-hypokinésie, sont représentées figure 45. Cette variation de masse est exprimée sous forme d'un rapport entre la masse du muscle et la masse de l'animal.

Une diminution significative de 40 % de la masse du soleus est observée après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; cette diminution de masse est encore plus marquée après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie (elle est alors de 59,6%), ce qui corrobore l'atrophie musculaire du soleus. Une diminution non significative est observée pour l'EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

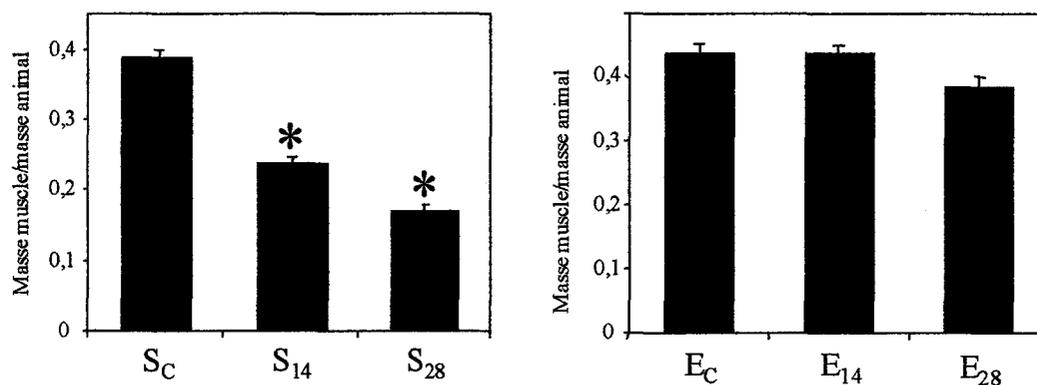


Figure 45 : Variation de la masse du muscle exprimée par rapport à la masse de l'animal (unité arbitraire). Les données sont indiquées \pm SEM, $n=6$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$). S_C : soleus contrôle ; S₁₄ : soleus après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; S₂₈ : soleus après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E_C : EDL contrôle ; E₁₄ : EDL après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E₂₈ : EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

2 – Dosage du taux global de O-GlcNAc.

a) Vérification du marquage.

Le dosage est réalisé par l'intermédiaire de la galactosyltransférase, transférant un résidu de galactose radiomarké sur les résidus de O-GlcNAc d'un pool total de protéines musculaires. Le taux de O-GlcNAc est déterminé par comptage de la radioactivité incorporée au niveau des résidus de O-GlcNAc additionnés du galactose radiomarké. Il nous fallait tout d'abord vérifier la spécificité du transfert du galactose, afin de déterminer si la radioactivité incorporée a lieu sur les résidus de O-GlcNAc et sur eux seuls.

La figure 46 représente les glycanes obtenus après traitement à la PNGase F, permettant de libérer les N-glycanes, puis β -élimination en milieu réducteur, permettant de libérer les O-glycanes. Les glycanes sont séparés par chromatographie sur couche mince puis révélés par pulvérisation d'orsinol sulfurique (figure 46-A) faisant suite à une autoradiographie (figure 46-B), permettant de mettre en évidence les produits radiomarkés.

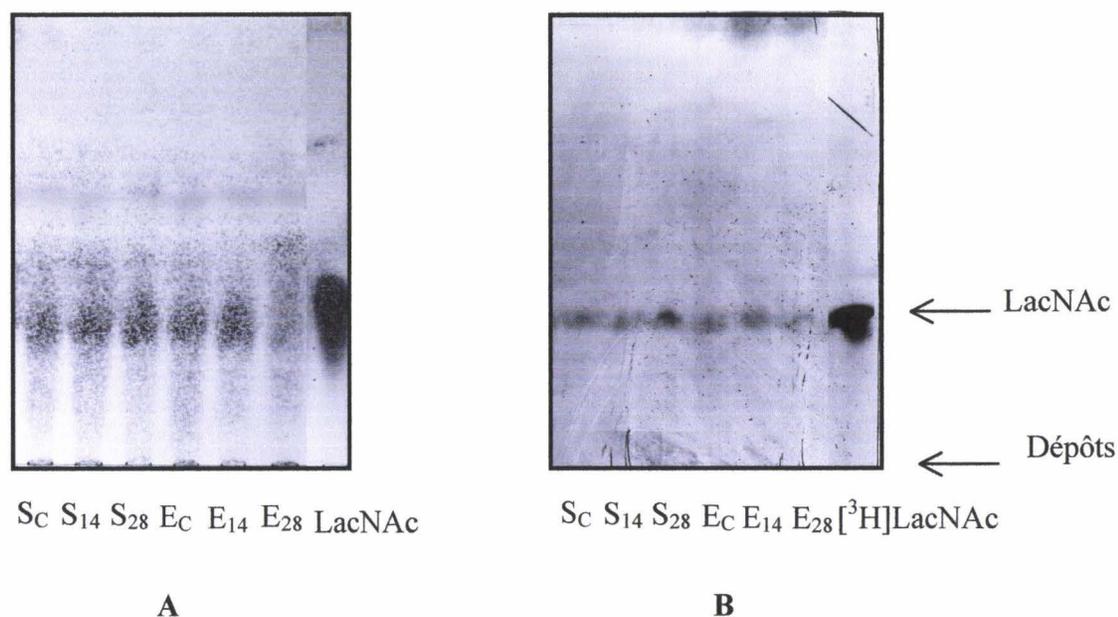


Figure 46 : Chromatographie sur couche mince des glycanes des protéines musculaires libérés par action de la PNGase F et β -élimination en milieu réducteur. (A) Révélation à l'orcinol sulfurique ; (B) Autoradiographie des produits tritiés.

Le seul produit obtenu correspond au N-acétyl-lactosaminitol, c'est-à-dire au motif Gal-GlcNAc^{ol}, puisque ce produit présente la même distance de migration que le standard LacNAc^{ol}, et c'est également la seule bande obtenue après autoradiographie. Ces données nous indiquent que seuls les résidus de *O*-GlcNAc sont marqués par la galactose tritié.

b) Variations du taux de *O*-GlcNAc.

Les variations du taux global de *O*-GlcNAc sont représentées figure 47, dans le soleus et l'EDL, après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

Nous pouvons dès lors constater que le taux de *O*-GlcNAc du muscle lent est supérieur à celui du muscle rapide (0,598 ng de *O*-GlcNAc pour 100 μ g de protéines musculaires dans le soleus, versus 0,491 ng de *O*-GlcNAc pour 100 μ g de protéines musculaires dans l'EDL). Après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie, le taux de *O*-GlcNAc diminue dans le soleus, de 0,598 ng de *O*-GlcNAc pour 100 μ g de protéines musculaires au niveau du contrôle à 0,526 et 0,510 ng de *O*-GlcNAc pour 100 μ g de protéines musculaires respectivement après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

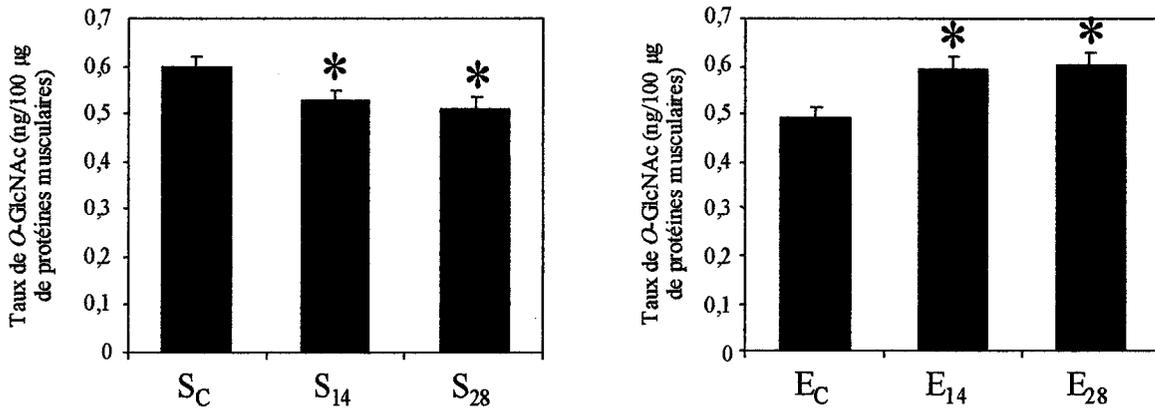


Figure 47 : Variations du taux global de O-GlcNAc dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie hypokinésie. Le taux de O-GlcNAc est exprimé en ng de O-GlcNAc pour 100 µg de protéines musculaires. Les données sont indiquées \pm SEM, $n=6$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$).

S_C : soleus contrôle ; *S₁₄* : soleus après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; *S₂₈* : soleus après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; *E_C* : EDL contrôle ; *E₁₄* : EDL après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; *E₂₈* : EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

Des variations du taux de O-GlcNAc sont également observées au niveau de l'EDL, et ce dans un sens inverse de ce qui est observé dans le soleus. En effet, on a une augmentation du taux global de O-GlcNAc dans l'EDL, de 0,491 ng de O-GlcNAc pour 100 µg de protéines musculaires dans les conditions contrôle à 0,593 et 0,602 ng de O-GlcNAc pour 100 µg de protéines musculaires respectivement après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

III – Variations des activités enzymatiques de la O-GlcNAc.

A – Activité de la O-GlcNAc transférase.

L'activité de la O-GlcNAc transférase a été déterminée dans le soleus et dans l'EDL, dans les conditions contrôle et après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. La mesure de l'activité de l'OGT est réalisée par comptage de la radioactivité incorporée sur un peptide synthétique de séquence YSDSPSTST après transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine radiomarqué et comptage de la radioactivité incorporée. Les variations de l'activité de la O-

GlcNAc transférase (OGT) sont représentées figure 48.

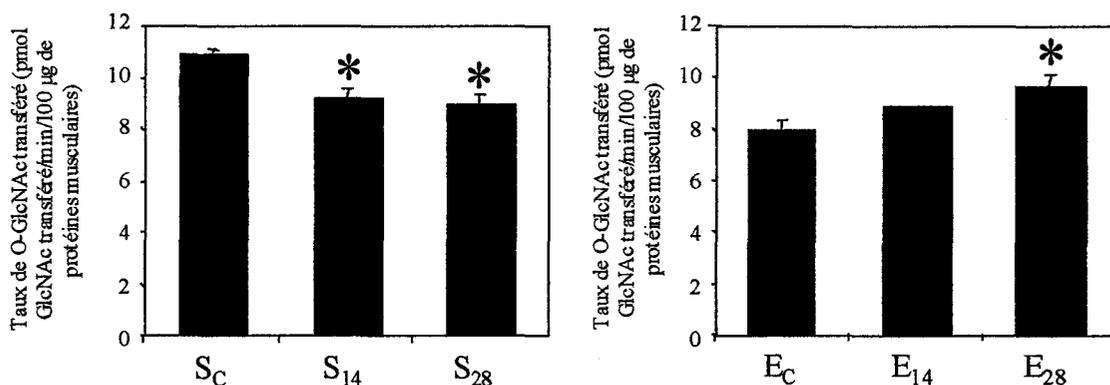


Figure 48 : Activité de la O-GlcNAc transférase dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'activité est exprimée en pmol de O-GlcNAc transférées par minute et pour 100 µg de protéines musculaires. Les données correspondant à des expériences réalisées en duplicate sont indiquées \pm SEM, n=3 pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p < 0,05$).

S_C : soleus contrôle ; S₁₄ : soleus après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; S₂₈ : soleus après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E_C : EDL contrôle ; E₁₄ : EDL après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E₂₈ : EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

L'activité de l'OGT diminue dans le soleus, de 10,94 pmol de GlcNAc transférées/minute/100 µg de protéines musculaires à 9,23 et 8,66 pmol de GlcNAc transférées/minute/100 µg de protéines après respectivement 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. Au contraire, l'activité OGT de l'EDL augmente après hypodynamie-hypokinésie, passant de 7,65 pmol de GlcNAc transférées/minute/100 µg de protéines à 8,85 et 9,11 pmol de GlcNAc transférées/minute/100 µg de protéines après respectivement 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

Ces résultats sont en corrélation avec les variations du taux global de O-GlcNAc, à savoir une diminution de O-GlcNAc dans le soleus, et une augmentation dans l'EDL. Enfin, l'activité O-GlcNAc transférase du soleus est supérieure à celle de l'EDL dans les conditions contrôle, ce qui est également en concordance avec les valeurs mesurées de O-GlcNAc.

B – Activité O-GlcNAcase.

L'activité de la O-GlcNAcase a été déterminée dans le soleus et dans l'EDL, dans les conditions contrôle et après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'activité de la O-GlcNAcase est mesurée par dosage spectrophotométrique de la quantité de PNP libéré après hydrolyse du substrat synthétique PNP-GlcNAc. Les variations de l'activité enzymatique O-GlcNAcase sont représentées figure 49.

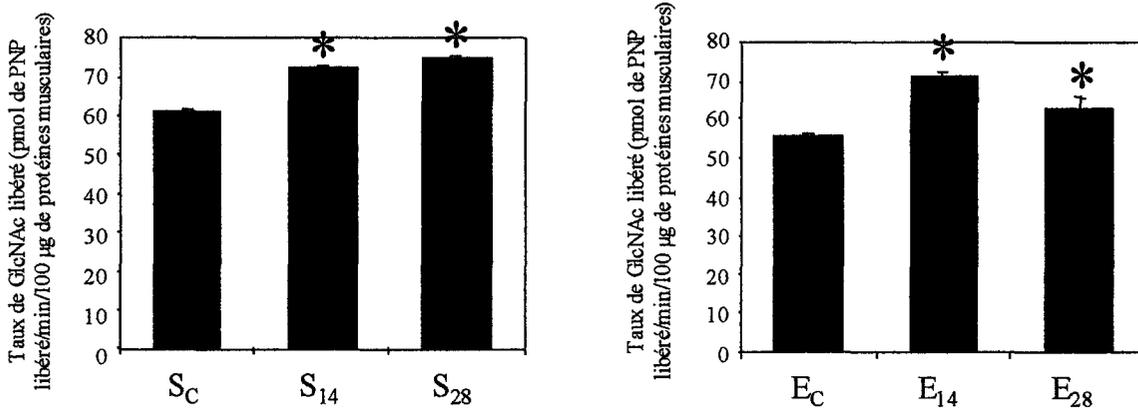


Figure 49 : *Activité de la O-GlcNAcase dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'activité est exprimée en pmol de PNP libéré/minute/100 µg de protéines musculaires. Les données correspondant à des expériences réalisées en duplicate sont indiquées ± SEM, n=3 pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes (p<0,05).*

S_C : soleus contrôle ; S₁₄ : soleus après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; S₂₈ : soleus après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E_C : EDL contrôle ; E₁₄ : EDL après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E₂₈ : EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

Dans le soleus, l'activité O-GlcNAcase est de 60,91 pmol PNP libéré/minute/100 µg de protéines musculaires. Cette activité augmente après hypodynamie-hypokinésie, jusqu'à des valeurs de 72,80 et 75,27 pmol PNP libéré/minute/100 µg de protéines musculaires après respectivement 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'activité de la O-GlcNAcase du soleus varie de manière inverse à l'activité OGT, ce qui corrobore les variations du taux de O-GlcNAc observées dans le soleus après hypodynamie-hypokinésie.

Au contraire, les variations de l'activité O-GlcNAcase semblent peu significatives au niveau de l'EDL. En effet, l'activité O-GlcNAc augmente tout d'abord de 55,35 à 71,30 pmol

de PNP libéré/minute/100 µg de protéines musculaires après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie, puis diminue à une valeur de 63,92 pmol de PNP libéré/minute/100 µg de protéines musculaires après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

C – Expression O-GlcNAc transférase/O-GlcNAcase.

L'analyse des ARNm de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase a également été envisagée afin de déterminer si les différences d'activité de ces deux enzymes, variables selon le type de muscle et après un épisode d'hypodynamie-hypokinésie, étaient liées à une expression différentes des transcripts de ces deux enzymes. Les résultats obtenus après analyse PCR des ARNm de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase sont représentés figure 50, et ceux obtenus après analyse densitométrique de l'expression des transcripts des deux enzymes sont représentés figure 51.

La taille des produits de PCR est de 152 paires de bases pour la O-GlcNAc transférase et de 252 paires de bases pour la O-GlcNAcase. Il n'y a aucune variation significative des transcripts de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase après hypodynamie-hypokinésie, de même qu'il n'y a pas de différence entre le soleus et l'EDL en condition contrôle.

Ainsi, les différences d'activités déterminées précédemment ne sont pas corrélées à une différence d'expression significative des transcripts de ces enzymes.

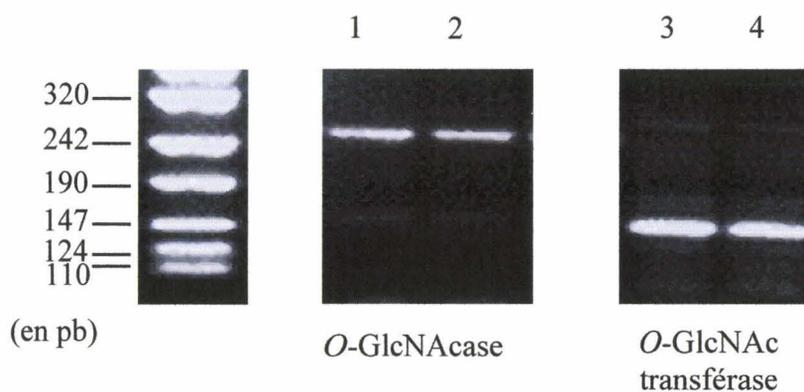


Figure 50 : Analyse des ARNm de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase déterminées après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. Analyse PCR de l'expression de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase dans le soleus (en 1 et en 3) et dans l'EDL (en 2 et en 4) respectivement dans des conditions contrôle.

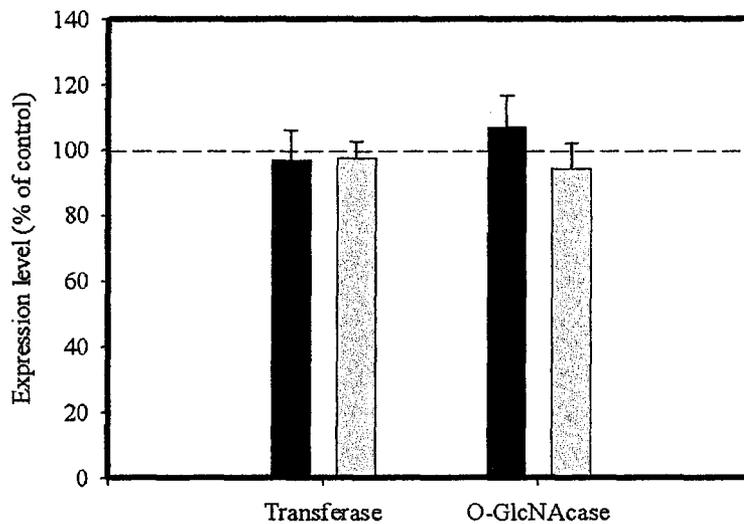


Figure 51 : Analyse densitométrique de l'expression des transcrits de la O-GlcNAc transfèrase et de la O-GlcNAcase dans le soleus (en noir) et dans l'EDL (en gris) après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie par comparaison avec le contrôle. L'intensité des signaux est corrigée par rapport au signal de la GAPDH obtenu pour les mêmes échantillons afin de corriger les variations liées à l'extraction, et les valeurs après hypodynamie-hypokinésie sont normalisées par rapport au contrôle. Les données sont indiquées \pm SEM, $n=5$ pour chaque groupe.

IV – Variations du taux de phosphate.

Le dosage du taux de phosphate est réalisé après hydrolyse acide des groupements phosphate d'un pool total de protéines musculaires par chromatographie liquide haute performance, la détection des ions phosphate se faisant par mesure de la conductimétrie. La figure 52 représente le chromatogramme obtenu pour l'un de nos échantillons (tracé noir), avec co-injection d'un standard phosphate (tracé bleu). Le phosphate présente un temps de rétention de 11,3 minutes. Le pic phosphate de l'échantillon co-migre avec le standard phosphate (ligne bleue sur la figure 52), ce qui confirme bien la nature de l'ion considéré dans nos mesures.

Les résultats obtenus sont représentés figure 53. Dans des conditions contrôles, on mesure dans le soleus 58,21 ng de phosphate pour 100 μ g de protéines musculaires, puis 64,28 et 53,33 ng de phosphate pour 100 μ g de protéines musculaires après respectivement 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'EDL présente 62,53 ng de phosphate pour 100 μ g

de protéines musculaires, puis 60,3 et 64,64 ng de phosphate pour 100 µg de protéines musculaires après respectivement 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

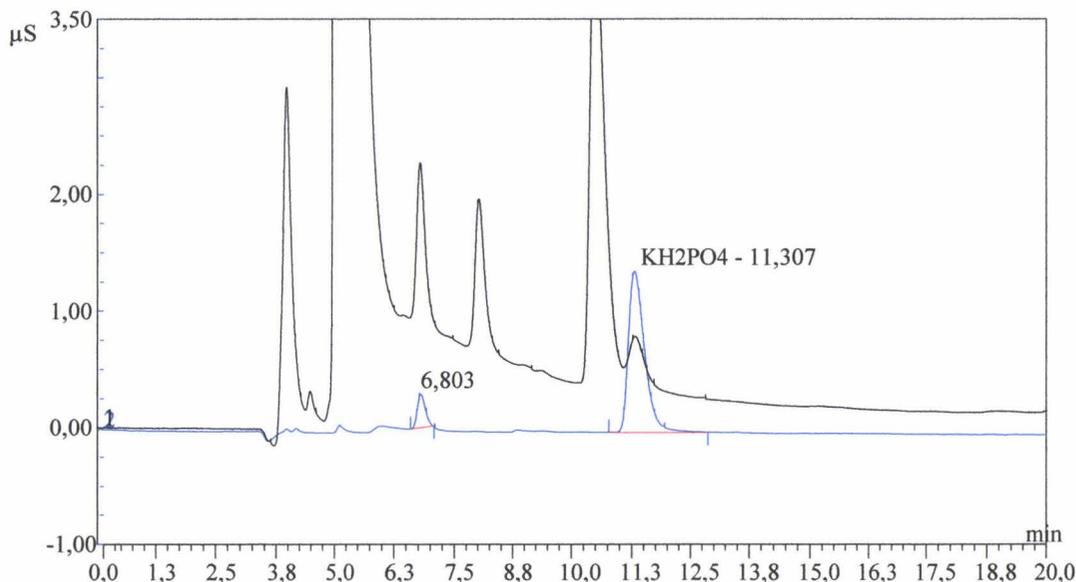


Figure 52 : Chromatogramme obtenu après séparation par HPLC des composés obtenus par hydrolyse acide de 200 µg de protéines musculaires et mesure de la concentration des ions phosphates par conductimétrie.

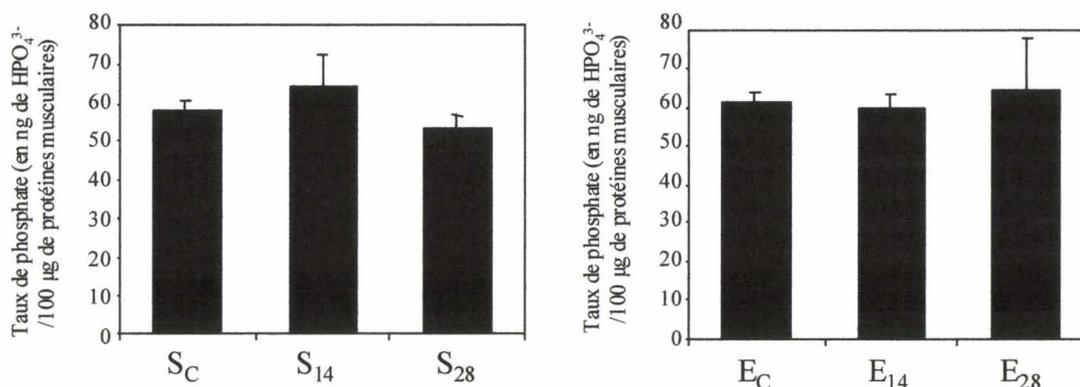


Figure 53 : Variations du taux global de phosphate dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie hypokinésie. Le taux de phosphate est exprimé en ng pour 100 µg de protéines musculaires. Les données correspondant à des expériences réalisées en duplicate sont indiquées ± SEM, n=3 pour chaque groupe.

S_C : soleus contrôle ; S₁₄ : soleus après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; S₂₈ : soleus après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E_C : EDL contrôle ; E₁₄ : EDL après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; E₂₈ : EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

Il s'avère donc que le taux de phosphate ne présente aucune variation significative après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie, ni dans le soleus, ni dans l'EDL, alors que nous avons observé une variation significative du taux global de O-GlcNAc. Il semble donc qu'au niveau des taux globaux, il n'y ait pas de balance phosphorylation/O-GlcNAc au cours de l'atrophie fonctionnelle.

V – Variations d'expression des protéines de choc thermique.

Les protéines musculaires sont séparées par SDS-PAGE 10%, et les protéines de choc thermique de 70 kDa sont révélées par immunoblot. Les Western blots ont été réalisés avec un anticorps dirigé contre la forme inductible de la protéine de choc thermique de 70 kDa (notée HSP70). Des mesures densitométriques sont réalisées sur les bandes révélées par l'anticorps anti-HSP70, et sont exprimées en pourcentage de variation par rapport à la valeur contrôle, permettent ainsi de déterminer les variations du taux d'expression des protéines de choc thermique.

La figure 54 met en évidence la différence d'expression d'HSP70 existant entre le soleus et l'EDL dans des conditions contrôles, tandis que la figure 55 représente les variations d'expression d'HSP70 après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie, respectivement pour le soleus et l'EDL.

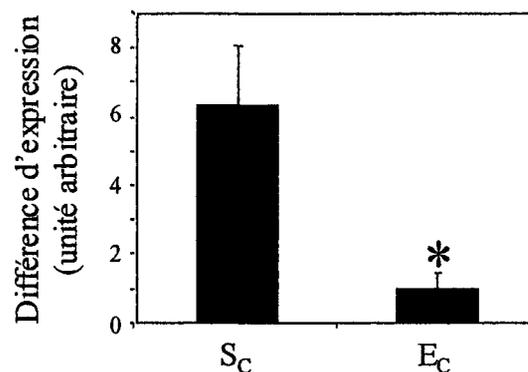


Figure 54 : Comparaison de l'intensité du signal d'HSP70 entre le soleus (S_C) et l'EDL (E_C) dans les conditions contrôles. Les mesures ont été effectuées sur le même blot, $n=3$ échantillons. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p < 0,05$).

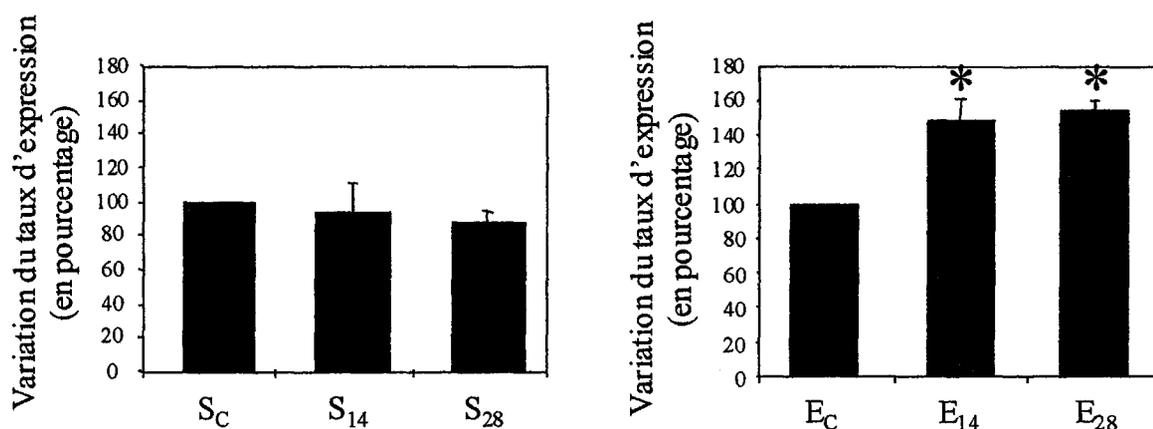


Figure 55 : Comparaison de l'expression d'HSP70 entre le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie par rapport au contrôle. Les mesures ont été effectuées sur le même blot, $n=3$ échantillons. Les données sont indiquées \pm SEM, $n=4$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$).

S_C : soleus contrôle ; *S₁₄* : soleus après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; *S₂₈* : soleus après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; *E_C* : EDL contrôle ; *E₁₄* : EDL après 14 jours d'hypodynamie-hypokinésie ; *E₂₈* : EDL après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie.

La forme inductible HSP70 est exprimée de manière beaucoup moins importante dans le muscle rapide EDL que dans le muscle lent soleus, comme le met en évidence la figure 54. Son expression n'est que peu modifiée après hypodynamie-hypokinésie dans le soleus, alors qu'au contraire elle augmente au sein de l'EDL après hypodynamie-hypokinésie (figure 55).

VI – Discussion.

A – Variation du taux de O-GlcNAc.

Nous avons démontré au cours de ce travail une corrélation entre les variations du taux global de O-GlcNAc et le développement de l'atrophie induite par hypodynamie-hypokinésie. Ainsi, on observe une diminution du taux de O-GlcNAc accompagnant la perte de masse du soleus après hypodynamie-hypokinésie, alors que le taux de O-GlcNAc augmente dans l'EDL, peu touché par l'atrophie. Cette diminution du taux de O-GlcNAc est observable après

14 jours d'hypodynamie-hypokinésie et est maintenue après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. Ces variations du taux de O-GlcNAc peuvent être directement corrélées aux variations d'activité des deux enzymes du cycle glycosylation/déglycosylation : la O-GlcNAc transférase et la O-GlcNAcase. En effet, on peut noter une diminution de l'activité O-GlcNAc transférase accompagnée d'une augmentation de l'activité O-GlcNAcase, conduisant à la diminution du taux de O-GlcNAc observée dans le soleus après hypodynamie-hypokinésie. De la même manière, il y a augmentation de l'activité O-GlcNAc transférase dans l'EDL, pouvant conduire à une augmentation du taux de O-GlcNAc dans le muscle rapide après hypodynamie-hypokinésie. Il est à noter que l'activité O-GlcNAc transférase est plus élevée dans le soleus que dans l'EDL, ce qui est en accord avec la différence de taux globaux de O-GlcNAc mesurés dans ces deux types de muscles.

Le même niveau d'expression des transcrits de ces deux enzymes est mesuré dans le muscle lent et dans le muscle rapide, sans variation significative après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie, et les différences d'activités enzymatiques observées ne semblent donc pas pouvoir être attribuées à une différence d'expression de ces enzymes.

Nous avons vu précédemment que la O-GlcNAc transférase, qui possède une multitude de substrats, n'est codée que par un seul gène. Les motifs TPR de la O-GlcNAc transférase, ainsi que les modifications post-traductionnelles de l'enzyme, peuvent réguler l'activité de l'enzyme (Kreppel et coll., 1997 ; Kreppel & Hart, 1999) ; il peut également exister des protéines accessoires influant sur l'activité et/ou la spécificité de l'OGT. Nous pouvons supposer que les différences d'activité de la O-GlcNAc transférase entre le muscle lent et le muscle rapide, mais également dans les deux types de muscle après un épisode d'hypodynamie-hypokinésie, peuvent être liées à une modulation de l'activité de la O-GlcNAc transférase plutôt qu'à une expression différentielle de la protéine.

B - Atrophie musculaire, HSP et dégradation protéasomale : quel est le rôle de la O-GlcNAc dans le processus d'atrophie musculaire ?

Au cours de ce travail, nous avons montré que le taux global de O-GlcNAc était augmenté dans l'EDL au cours de l'atrophie fonctionnelle, alors qu'une diminution du taux de O-GlcNAc est mesurée dans le soleus, accompagnant le développement de l'atrophie. Différents travaux montrent que la diminution de la masse du muscle après une courte période d'hypodynamie-hypokinésie, particulièrement bien marquée pour les muscles antigravitaires

tels que le soleus, s'accompagne 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 (Steffen & Musacchia, 1985 ; Goldspink et coll., 1986 ; Thomason et coll., 1987 ; Thomason et coll., 1989 ; Edgerton & Roy, 1991). 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 lors de l'atrophie musculaire (Bodine et coll., 2001 ; Price, 2003). Il a par ailleurs été démontré que des inhibiteurs du protéasome, tels que le MG132, réduit le phénomène de protéolyse observé lors de l'atrophie des muscles squelettiques (Tawa et coll., 1997). Il a récemment été démontré que le protéasome lui-même est régulé par l'intermédiaire de la O-GlcNAc, cette modification post-traductionnelle l'inhibant de manière réversible (Zhang et coll., 2003). D'autre part, la O-GlcNAc protégerait également certaines protéines vis-à-vis de la dégradation protéasomale (Han & Kudlow, 1997; Cheng et coll., 2000 ; Hattell et coll., 2003). Il a également été démontré que le taux de O-GlcNAc 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 (Zacchara et coll., 2004). Le fait de « bloquer » la O-GlcNAc ou d'en diminuer le taux augmente la sensibilité des cellules au stress, provoquant une diminution de la survie de ces cellules, alors qu'au contraire une augmentation du taux de O-GlcNAc protège les cellules vis-à-vis des différentes formes de stress. Le mécanisme par lequel la O-GlcNAc protégerait la cellule contre les différentes formes de stress se fait *via* les protéines de choc thermique HSP70 et HSP40 (Zacchara et coll., 2004). 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 coll., 2004). Ces données récentes impliquent que l'augmentation du taux de O-GlcNAc au niveau 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 coll., 2005), les protéines oxydées étant plus sensibles aux attaques protéolytiques. Ainsi, l'hypodynamie-hypokinésie augmente le stress oxydatif en déséquilibrant le système anti-oxydant de la cellule musculaire (Lawler et coll., 2003). Un rôle d'HSP70 dans le processus d'atrophie musculaire a également été considéré, puisque

l'atrophie résultante d'une hypodynamie-hypokinésie est atténuée lorsque les animaux sont soumis à un choc thermique avant l'hypodynamie-hypokinésie (Naito et coll., 2000).

A partir de toutes ces données, il est donc concevable de supposer qu'une augmentation du taux de *O*-GlcNAc concomitante à l'augmentation du taux de HSP70 puisse prévenir de la dégradation des protéines par le protéasome, et donc limiter le développement de l'atrophie lié en partie à la dégradation protéique. Ainsi, nous avons montré dans ce travail une augmentation du taux de *O*-GlcNAc et du niveau d'expression de HSP70 dans l'EDL, qui n'est pas touché par l'atrophie fonctionnelle de non-utilisation, et au contraire une diminution du taux de *O*-GlcNAc dans le soleus qui s'atrophie au cours de l'hypodynamie-hypokinésie. Nous pouvons noter que le taux d'expression de HSP70 est tout de même plus élevé dans le soleus par rapport à l'EDL. En effet, la protéine HSP70 est exprimée de manière constitutive dans les muscles non stressés composés principalement de fibres lentes de type I (Locke et coll., 1991) ; l'expression plus importante de HSP70 dans le muscle lent par rapport au muscle rapide peut être attribuée au métabolisme oxydatif du muscle lent. Cependant, ce taux de HSP70 n'est pas modifié après hypodynamie-hypokinésie, alors que le stress oxydatif est accru. Une explication possible serait que le muscle lent ne puisse pas contrebalancer l'augmentation de la dégradation des protéines à l'origine de l'atrophie musculaire.

Nos résultats suggèrent donc que les variations du taux de *O*-GlcNAc peuvent être associées au développement de l'atrophie musculaire et que la *O*-GlcNAc pourrait protéger les protéines contre la dégradation protéasomale. Ainsi, une diminution du taux de *O*-GlcNAc associée à une augmentation du stress oxydatif pourrait induire le développement de l'atrophie musculaire observé après hypodynamie-hypokinésie, tandis qu'une augmentation du taux de *O*-GlcNAc pourrait protéger les protéines ainsi glycosylées contre la dégradation, et donc prévenir le muscle de l'atrophie.

En conclusion, nos résultats démontrent que la variation du taux de *O*-GlcNAc, corrélées aux variations d'expression de la protéine de choc thermique HSP70, peut être associée au développement de l'atrophie musculaire induite par hypodynamie-hypokinésie. Ces données suggèrent que la *O*-GlcNAc pourrait être liée au contrôle de l'homéostasie des protéines musculaires.

Troisième partie

*Implication de la O-
GlcNAc dans les
propriétés contractiles du
muscle squelettique*

I – Problématique.

L'activité contractile est la fonction principale du muscle squelettique. Nous avons démontré dans la première partie de ce travail que les chaînes lourdes de myosine ainsi que l'actine sont modifiées par la *O*-GlcNAc. D'autres protéines contractiles pourraient également porter ce motif *O*-GlcNAc. Il nous a donc semblé essentiel de déterminer l'influence de la *O*-GlcNAc sur l'activité contractile du muscle. Pour ce faire, nous avons entrepris d'identifier les protéines contractiles portant le motif *O*-GlcNAc et/ou présentant une activité lectinique vis-à-vis de ce monosaccharide afin de déterminer si certaines des interactions protéine-protéine du myofilament sont dépendantes de ce motif *O*-GlcNAc. Nous avons également, dans une seconde approche, étudié l'influence de la *O*-GlcNAc sur la contraction musculaire par l'intermédiaire de l'étude de la relation tension/pCa au niveau de fibres musculaires.

II – Purification des protéines contractiles modifiées par la *O*-GlcNAc et/ou présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif *O*-GlcNAc.

A – Purification des protéines contractiles.

Afin d'étudier plus spécifiquement les protéines contractiles portant un motif *O*-GlcNAc, nous avons entrepris d'enrichir nos échantillons de muscle total en protéines contractiles avant de réaliser les chromatographies d'affinité qui nous permettront d'isoler d'une part les protéines-*O*-GlcNAc, et d'autre part les lectines vis-à-vis de ce motif *O*-GlcNAc.

L'extraction des protéines contractiles est réalisée en jouant sur la force ionique de la solution dans laquelle est homogénéisée la poudre de muscle suivant un protocole déjà utilisé au laboratoire (Toursel et coll., 2000). La figure 56 représente l'enrichissement en protéines contractiles (puits 2) par rapport à un pool total de protéines musculaires (puits 1). Les différentes étapes de ce protocole permettent d'aboutir à l'obtention d'un culot de protéines contractiles ; l'analyse électrophorétique de ce culot de protéines contractiles permet de visualiser aisément les chaînes lourdes de myosine, l'actine, les isoformes de tropomyosine ainsi que les chaînes légères de myosine. L'identification de ces protéines clé de la contraction musculaire a été réalisée au cours de nombreux travaux du laboratoire (Stevens et

coll., 1999 ; Kischel et coll., 2001 ; Bastide et coll., 2002 ; Stevens et coll., 2002).

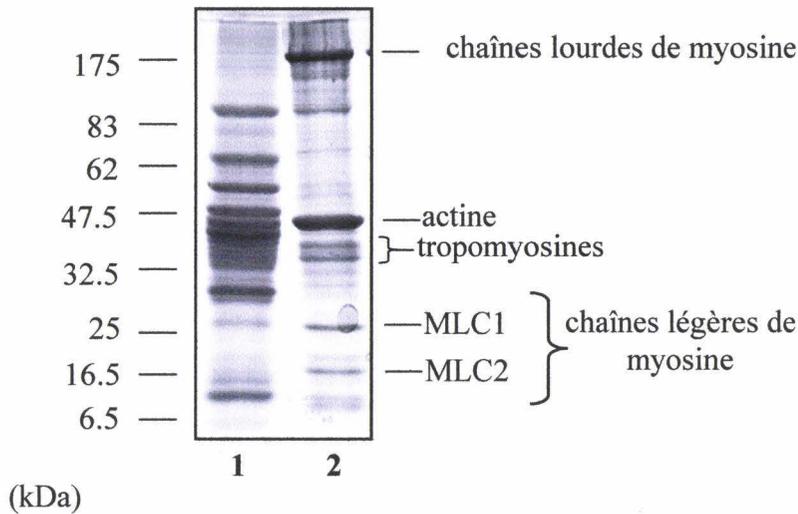


Figure 56 : *Enrichissement d'un échantillon de gastrocnemius en protéines contractiles. (1) protéines totales ; (2) protéines contractiles.*

B – Purification des protéines contractiles-*O*-GlcNAc.

Les protéines contractiles enrichies à partir du muscle total selon le protocole décrit précédemment ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de WGA-immobilisée sur billes d'agarose. Le pool de protéines contractiles est représenté au niveau du puits 1 sur la figure 57. Un premier lavage de la colonne est réalisé par 0,5 M de N-acétylgalactosamine (puits 2 sur la figure 57) afin d'éliminer les interactions non spécifiques entre les protéines et la colonne, puis les protéines-*O*-GlcNAc retenues sur la colonne de WGA sont éluées spécifiquement par 0,5 M de N-acétylglucosamine (puits 3).

Cette purification des protéines contractiles portant le motif *O*-GlcNAc est réalisée à la fois sur le soleus et sur l'EDL. Les différentes fractions de protéines ainsi obtenues après purification sur colonne de WGA sont analysées par SDS-PAGE 10-20%, le gel étant coloré au nitrate d'argent (figure 57).

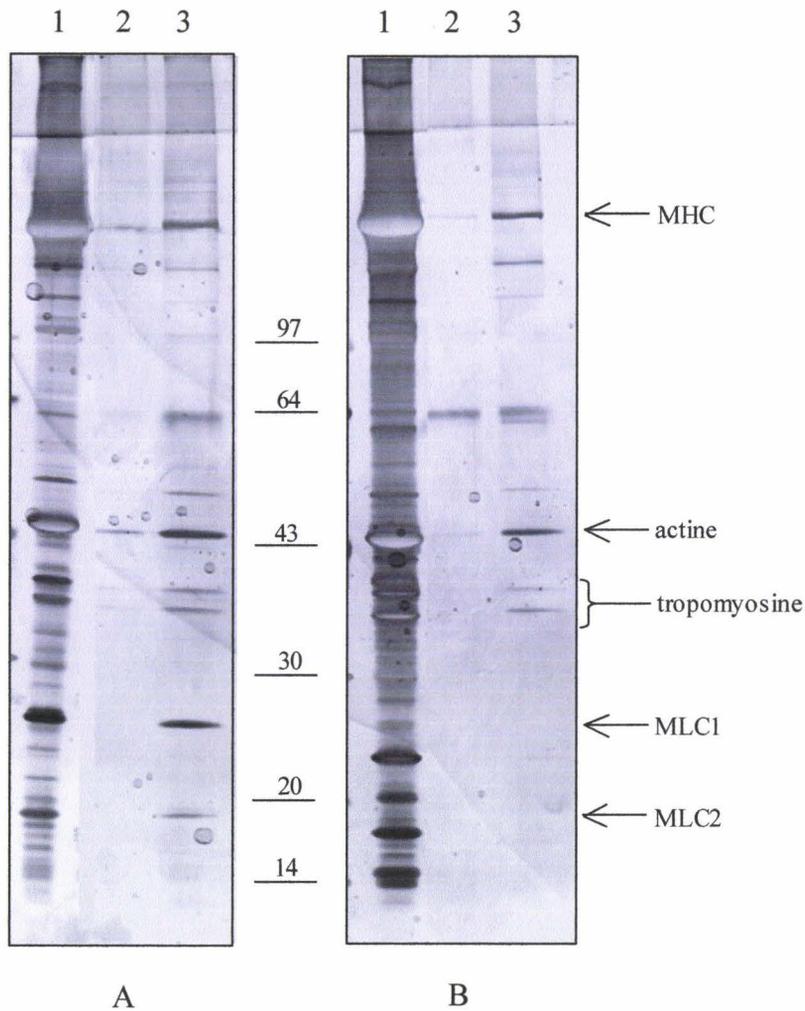


Figure 57 : SDS-PAGE 10-20 % et coloration au nitrate d'argent des protéines contractiles purifiées sur colonne de WGA-immobilisée à partir du muscle lent soleus (en A) et du muscle rapide EDL (en B).

1 : protéines contractiles ; 2 : lavage GalNAc 0,5 M ; 3 : élution GlcNAc 0,5 M.

Le faible signal obtenu au niveau des puits 2 de la figure 57, respectivement pour le soleus et l'EDL, nous indique que les protéines retenues sur la colonne de WGA ne sont pas ou alors très faiblement éluées par la N-acétylgalactosamine. Cette faible « élution » par la GalNAc peut correspondre à des états faiblement glycosylés de la protéine ou à une saturation de la colonne par le matériel biologique. Les protéines retenues sur la colonne de WGA et éluées spécifiquement par la N-acétylglucosamine sont représentées au niveau des puits 3 de la figure 57. Afin de bien confirmer la nature O-N-acétylglucosaminylée des protéines contractiles retenues sur colonne de WGA, celles-ci seront analysées par chromatographie en phase gazeuse afin d'identifier la nature de la glycosylation portée par ces protéines.

Par ailleurs, la similitude des profils protéiques des protéines-O-GlcNAc (puits 3 de la figure 57) entre le soleus et l'EDL nous indique que les mêmes protéines sont modifiées par la

O-GlcNAc à la fois dans le muscle lent et dans le muscle rapide. Selon leur migration électrophorétique, certaines d'entre elles peuvent être identifiées comme l'actine, la tropomyosine ainsi que les chaînes légères de myosine. Leur identité sera confirmée ultérieurement.

C – Confirmation de la nature O-GlcNAc des protéines contractiles.

Nous avons utilisé un moyen d'investigation rapide de la nature O-N-acétylglucosaminylée d'une protéine (Verbert et coll., 1995). Cette méthode permet de confirmer l'existence d'un résidu de O-GlcNAc sur une protéine après avoir effectué diverses autres méthodes (telle que la reconnaissance lectinique par exemple). Afin de confirmer la nature O-GlcNAc des protéines contractiles, nous avons donc entrepris d'analyser les glycanes O-liés libérés des protéines après β -élimination en milieu réducteur, celles-ci étant préalablement séparées par SDS-PAGE 10-20%, puis transférées sur membrane de PVDF. Après coloration de la membrane au bleu de Coomassie, les bandes protéiques d'intérêt sont excisées de la membrane, et la β -élimination en milieu réducteur est réalisée directement sur ces fragments de membrane. Les alditols ainsi libérés sont peracétylés puis extraits en phase chloroformique, cette phase étant analysée par chromatographie en phase gazeuse, couplée ou non à la spectrométrie de masse.

Cette technique a été appliquée pour toutes nos protéines d'intérêt, c'est-à-dire les chaînes lourdes de myosine, l'actine, les tropomyosines ainsi que les isoformes lentes et rapides des chaînes légères de myosine (MLC1 et MLC2). Seuls les résultats de la MLC2s sont illustrés figure 58.

Le chromatogramme représenté figure 58-A indique la présence d'un composé issu de la MLC2s présentant un temps de rétention 32,10 min. Or, le témoin GlcNAc^{ol} peracétylé présente le même temps de rétention. Il semble donc que la MLC2s soit O-GlcNAc. La présence de la O-GlcNAc sera confirmée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

L'utilisation de la GC-MS permet d'obtenir un spectre de fragmentation d'un composé séparé par chromatographie en phase gazeuse ; la figure 58-B représente le spectre de fragmentation du composé de temps de rétention de 32,10 min. Il s'avère que les ions obtenus

par spectrométrie de masse correspondent à ceux du peracétylglucosaminitol, issu du motif O-GlcNAc présent au niveau de notre protéine d'intérêt, ici la MLC2s.

Cette analyse a également été réalisée sur les autres protéines contractiles. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau X.

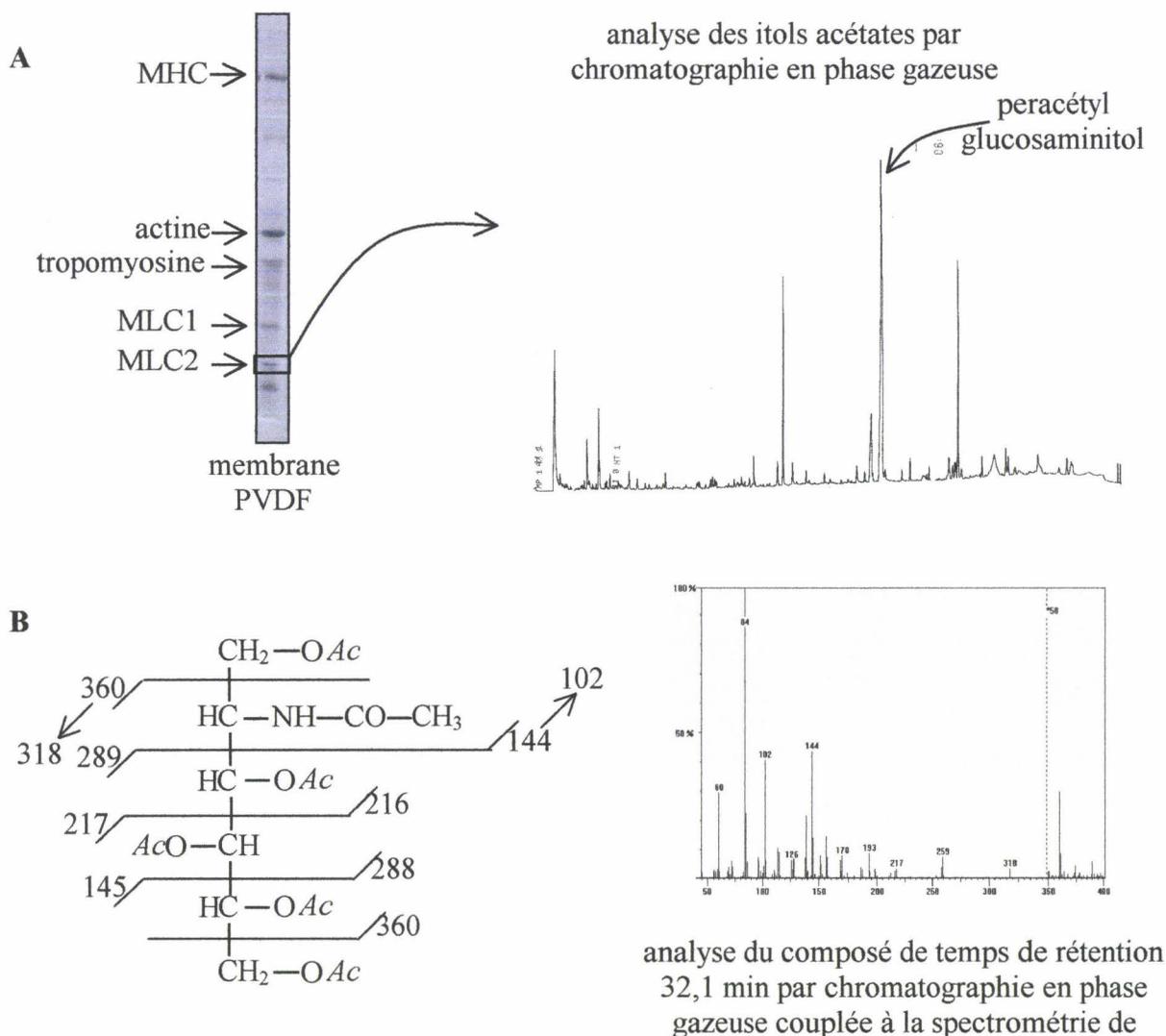


Figure 58 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des alditols acétates libérés d'une protéine préalablement séparée par SDS-PAGE. (A) Chromatogramme obtenu pour la bande protéique correspondant à la MLC2s ; (B) Spectre de fragmentation obtenu par analyse en chromatographie en phase gazeuse du composé de temps de rétention 32,1 minutes.

Tableau X : Tableau récapitulatif des résultats obtenus après analyse des alditols acétates libérés d'une protéine. Les résultats indiquent la présence d'un composé de temps de rétention 32,1 minutes, l'identité de ce composé étant confirmée par GC-MS.

	Présence du pic de même temps de rétention que la GlcNAc ^{ol} peracétylée	Confirmation GC-MS
MHC	32,13 minutes	oui
Actine	32,23 minutes	oui
Tropomyosine	32,11 minutes	oui
MLC1s	32,11 minutes	oui
MLC2s	32,10 minutes	oui
MLC1f	32,13 minutes	oui
MLC2f	32,12 minutes	oui

Les résultats ainsi obtenus par l'analyse des alditols acétates nous ont donc permis de confirmer la nature O-GlcNAc des protéines contractiles purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de WGA-immobilisée. Les chaînes lourdes de myosine, l'actine, la tropomyosine ainsi que les chaînes légères de myosine (régulatrice et essentielle) sont donc modifiées par le motif O-GlcNAc.

D – Purification des protéines contractiles présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif O-GlcNAc.

L'enrichissement de nos échantillons en protéines contractiles est réalisé selon le protocole défini précédemment. Les protéines contractiles (puits 1 sur la figure 59, respectivement pour le soleus (en A) et pour l'EDL (en B) sont purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne de N-acétylglucosamine immobilisée sur billes d'agarose. Les protéines retenues non spécifiquement sur la colonne sont lavées en présence de 0,5 M de N-acétyl galactosamine (puits 2) tandis que les protéines retenues spécifiquement sur la colonne sont éluées par 0,5 M de N-acétylglucosamine (puits 3).

Des protéines contractiles sont retenues sur la colonne de GlcNAc-immobilisée, et le

très faible signal obtenu au niveau des puits 2 de la figure 59, correspondant à l'éluion GalNAc, nous indique que les protéines retenues sur la colonne de billes de GlcNAc-immobilisée reconnaissent spécifiquement le motif N-acétylglucosamine, et donc sont lectines vis-à-vis de ce motif O-GlcNAc.

Par ailleurs, la similitude des profils protéiques des protéines lectines à O-GlcNAc (puits 3 de la figure 59, respectivement le soleus et l'EDL) nous indique que les mêmes protéines contractiles présentent des propriétés lectiniques pour ces deux types de muscle. Il est à noter que les profils protéiques ici obtenus sont proches de ceux de la figure 57.

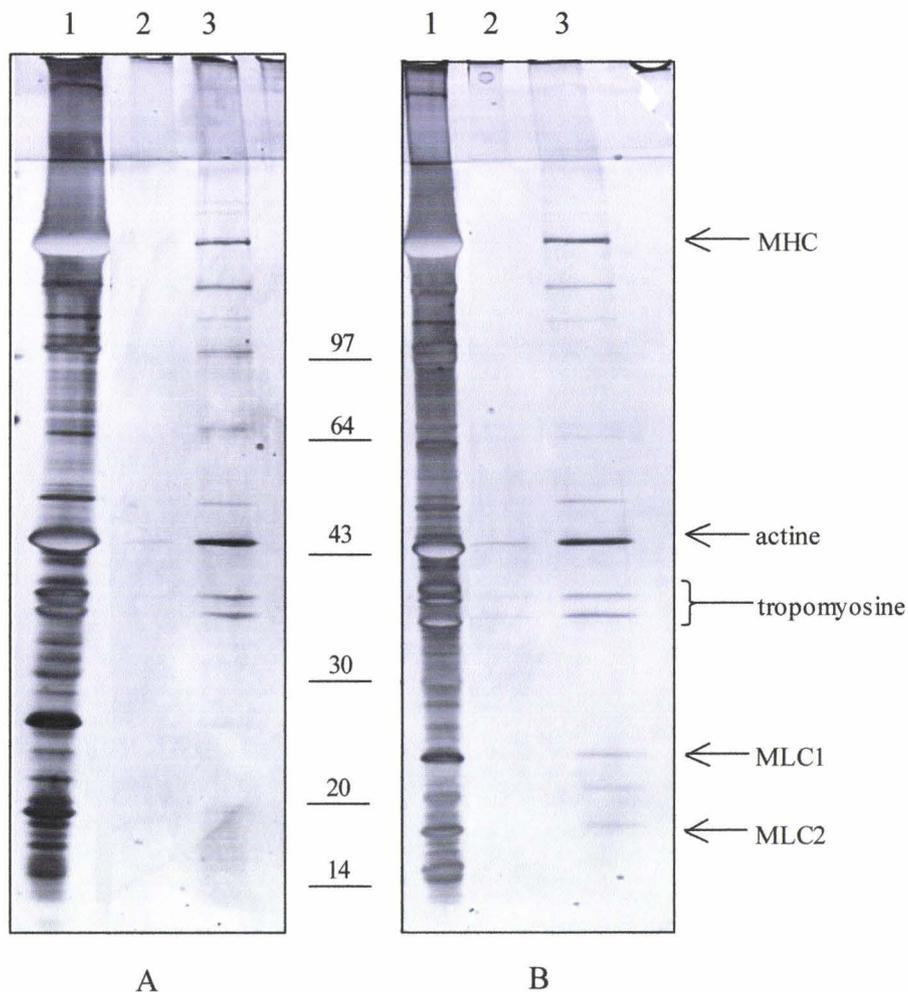


Figure 59 : SDS-PAGE 10-20 % et coloration au nitrate d'argent des protéines contractiles purifiées sur colonne de GlcNAc-immobilisée à partir du muscle lent soleus (en A) et du muscle rapide EDL (en B).

1 : protéines contractiles ; 2 : lavage GalNAc 0,5 M ; 3 : éluion GlcNAc 0,5 M.

Les bandes protéiques d'intérêt sont excisées du gel, puis digérées par la trypsine après réduction/alkylation en vue de la confirmation de leur identité par spectrométrie de masse de

type MALDI-TOF.

E - Identification des protéines contractiles présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif *O-GlcNAc* par approche protéomique.

L'identification des protéines contractiles présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif *O-GlcNAc* a été réalisée à la fois dans le soleus et dans l'EDL. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau XI, indiquant les protéines contractiles considérées dans notre étude, le score obtenu dans le moteur de recherche Protein Prospector, le nombre de peptides expérimentaux appartenant au spectre théorique, ainsi que le pourcentage de séquence recouverte. La présence du motif *O-GlcNAc* sur chacune des protéines, mise en évidence par purification par chromatographie d'affinité et par chromatographie en phase gazeuse est également indiquée.

Nos résultats indiquent que les chaînes lourdes et légères de myosine ainsi que l'actine, modifiées par la *O-GlcNAc*, présentent également une activité lectinique vis-à-vis de ce monosaccharide. Les isoformes de tropomyosines n'ont pas été identifiées avec succès dans ces études, bien que leur identification sur le gel ne semblait poser aucune ambiguïté. Par ailleurs, aucune protéine n'a été identifiée comme une troponine (qu'il s'agisse de la TnC, de la TnI ou de la TnT) ; en effet, ces protéines régulatrices sont présentes en faible quantité dans le muscle squelettique, et plus difficiles à visualiser par simple coloration après électrophorèse, ce qui rend impossible leur identification par analyse protéomique. Il est cependant possible qu'une ou plusieurs troponine(s) soit(ent) *O-GlcNAc* et/ou lectine vis-à-vis du motif *O-GlcNAc*.

Tableau XI : Identification des protéines contractiles lectines à O-GlcNAc par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Leur modification par la O-GlcNAc est également indiquée.

Protéines contractiles	LECTINE ?	Score (Protein Prospector)	Nombre de peptides	% séquence recouverte	O-GlcNAc ?
<u>Soleus</u>					
<i>MHC</i>	oui	7.95e+4	17	9	oui
<i>Actine</i>	oui	6.82e+9	17	47	oui
<i>Tropomyosine</i>	oui ?	/	/	/	oui
<i>MLC1s</i>	oui	4.82e+6	13	61	oui
<i>MLC2s</i>	oui	8.58e+11	15	80	oui
<i>Troponines</i>	?	/	/	/	?
<u>EDL</u>					
<i>MHC</i>	oui	2.03e+4	12	13	oui
<i>Actine</i>	oui	7.37e+5	9	33	oui
<i>Tropomyosine</i>	oui ?	/	/	/	oui
<i>MLC2s</i>	oui	5.60e+4	10	27	oui
<i>MLC2f</i>	oui	3.07e+11	19	88	oui
<i>Troponines</i>	?	/	/	/	?

III – Localisation de sites modifiés par la O-GlcNAc.

A – Principe de la détermination des sites de O-GlcNAc.

Le principe permettant de déterminer les sites de O-GlcNAc est rappelé figure 60. Brièvement, deux pools protéiques identiques sont utilisés ; l'un d'eux est marqué au galactose tritié par l'intermédiaire de la galactosyltransférase, tandis que l'autre est marqué au galactose froid. Chacun de ces pools protéiques est séparé par électrophorèse monodimensionnelle. Les bandes correspondant à la protéine radiomarquée et à la protéine

froide sont découpées dans chacun des puits, puis digérées par la trypsine. Les peptides sont extraits du gel puis séparés par chromatographie liquide haute performance (HLPC) sur une colonne de C₁₈ en phase inverse ; 80 fractions sont ainsi collectées.

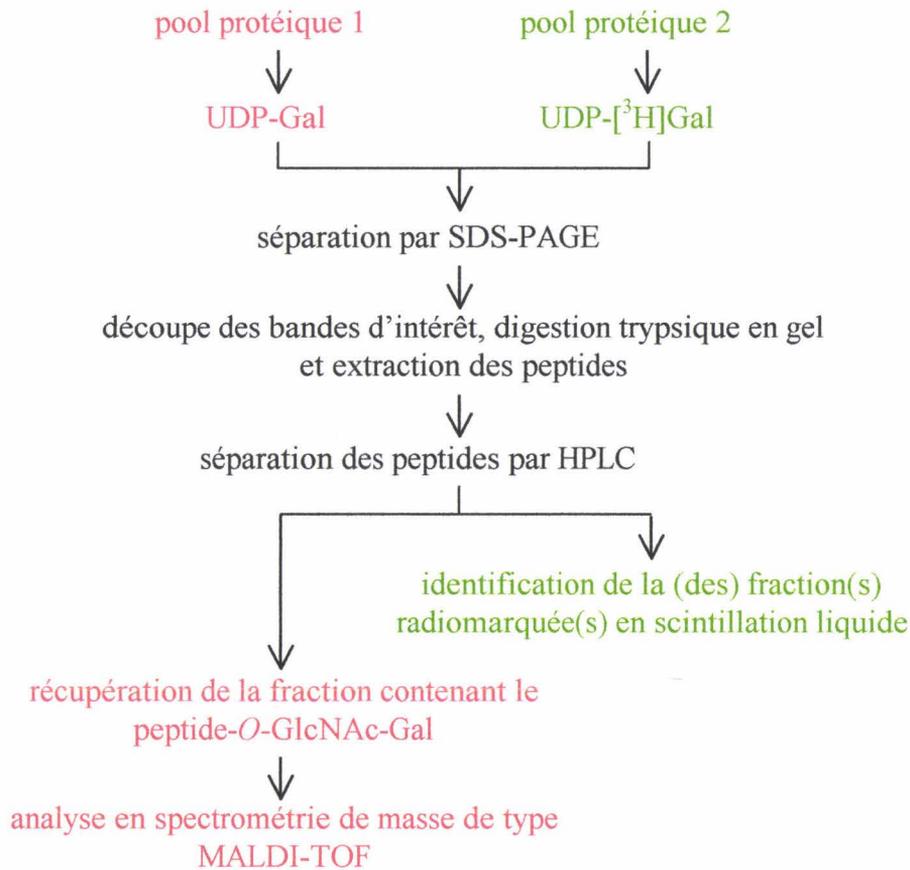


Figure 60 : Principe de la détermination des sites de O-GlcNAc. En rouge est représentée la méthodologie utilisée pour la protéine « froide », et en vert celle utilisée pour la protéine radiomarquée.

Les fractions issues de la séparation des peptides radiomarqués sont comptées en scintillation liquide ; on peut ainsi déterminer la (ou les) fraction(s) peptidique(s) contenant le (ou les) peptide(s) glycosylé(s), correspondant à la (ou aux) fraction(s) radiomarquée(s). Les peptides marqués au galactose froid sont séparés dans les mêmes conditions, et la (ou les) fraction(s) contenant le(s) peptide(s) glycosylé(s) est (sont) analysée(s) en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

B- Détermination du site de O-GlcNAc sur la MLC2s.

Les protéines contractiles sont séparées par SDS-PAGE 10-20% après marquage par la

galactosyltransférase (avec d'une part l'UDP-[³H]Gal et d'autre part l'UDP-Gal froid), et le gel est coloré au bleu de Coomassie. La bande protéique correspondant à la MLC2s est excisée du gel et soumise à l'hydrolyse trypsique. Les peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la chaîne légère de myosine régulatrice (isoforme lente) sont séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur une colonne en phase inverse C₁₈ (RP-HPLC : reverse phase – high performance liquid chromatography). Le profil chromatographique obtenu pour la protéine froide est représenté figure 61. Le profil chromatographique de la protéine radiomarquée est identique. Les fractions issues de la séparation des peptides radiomarqués sont comptées en scintillation liquide ; il s'avère que les fractions 58 et 59 sont radioactives.

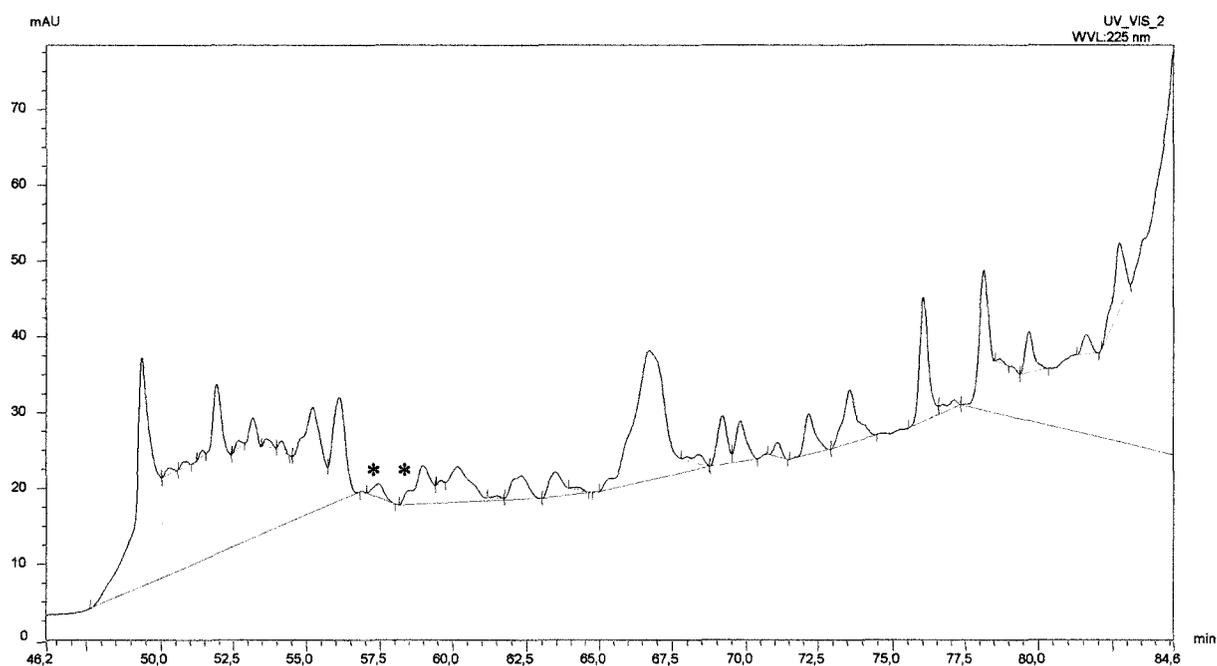


Figure 61: Profil chromatographique obtenu après séparation par HPLC des peptides trypsiniques de la MLC2s. Le symbole * correspond aux fractions radiomarquées, et donc contenant le (ou les) peptide(s) glycosylé(s), respectivement les fractions 58 et 59.

Les fractions 58 et 59 correspondant à la séparation des peptides marqués au galactose froid sont analysées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les spectre MALDI ainsi obtenus sont représentés figure 62, avec en A le spectre MALDI de la fraction 58 et en B celui de la fraction 59.

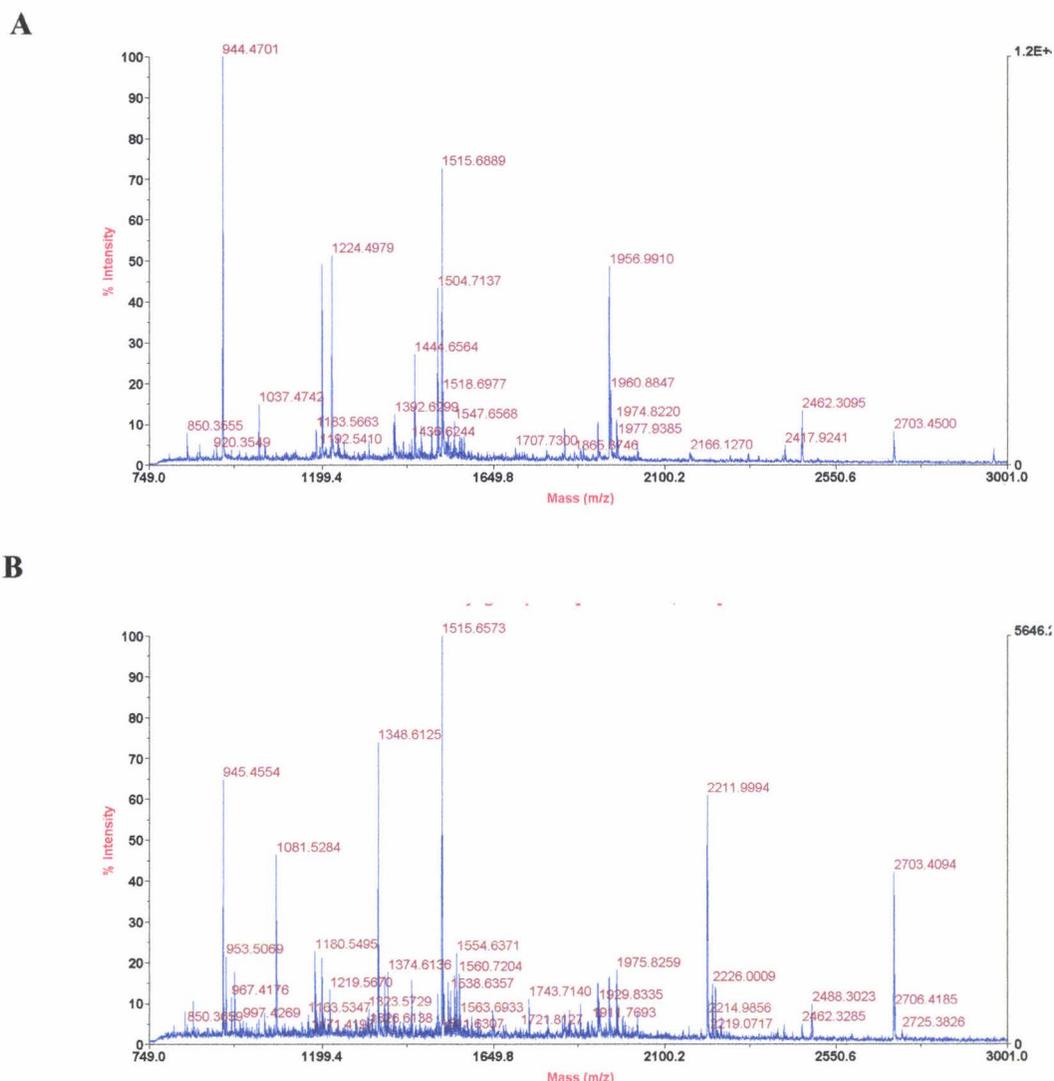


Figure 62 : Analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF des fractions 58 (en A) et 59 (en B) obtenues après séparation des peptides tryptiques de la MLC2s par HPLC en phase inverse.

Certains des peptides sont communs aux deux spectres, tandis que d'autres sont présents plus spécifiquement dans l'une ou l'autre des fractions. La comparaison de l'empreinte peptidique expérimentale de chacune de nos fraction avec l'empreinte peptidique théorique de la MLC2s (obtenue par digestion *in silico* réalisée par la trypsine) nous a permis d'identifier un certain nombre de peptides appartenant à la séquence de la MLC2s dans nos fractions HPLC. L'ensemble de ces peptides est regroupé dans le tableau XII.

Tableau XII: Peptides de la MLC2s retrouvés dans les fractions HPLC 58 et 59. Sont indiqués la masse (m/z) du pic concerné ainsi que la séquence peptidique correspondante.

Masse monoisotopique (m/z)	Peptide	Séquence en amino-acides
FRACTION 58		
850, 4423	50-57	(R)DTFAALGR(V)
1192, 5962	40-49	(R)DGFIDKNDLR(D)
1224, 5683	30-39	(K)AEFTIMDQNR(D)
1240, 5632	30-39	(K)AEFTIMoxDQNR(D)
1389, 7490	153-164	(K)NLVHIITHGEEK(D)
1456, 7106	120-131	(R)EMLTTQAERFSK(E)
1504, 7760	153-165	(K)NLVHIITHGEEKD(-)
1560, 7943	58-70	(R)VNVKNEEIDEMIK(E)
1788, 9721	46-61	(K)NDLRDTFAALGRVNVK(N)
2416, 1019	132-152	(K)EEIDQMFAAFPDPVTGNJDYK(N)
2418, 2557	89-110	(K)LKGADPEETILNAFKVFDPEGK(G)
FRACTION 59		
1348, 6973	46-57	(K)NDLRDTFAALGR(V)
1899, 8911	30-45	(K)EAFTIMDQNRDGFIDK(N)
1998, 0047	71-88	(K)AEPGPINFTVFLTMFGEK(L)
2239, 1837	71-90	(K)EAPGPINFTVFLTMFGEK(L)
2398, 1461	30-49	(K)EAFTIMDQNRDGFIDKNDLR(D)
2414, 1410	30-49	(K)EAFTIMoxDQNRDGFIDKNDLR(D)
2422, 1237	9-29	(R)LEGGSSNVFSMFEQTQIQEFK(E)

Parmi les autres pics du spectre expérimental, nous avons également identifié six pics correspondant à des pics du spectre théorique avec un incrément de masse de 366, cet incrément de masse correspondant à la masse du résidu de O-GlcNAc additionné du galactose. Ces pics sont indiqués dans le tableau XIII, ainsi que la séquence peptidique correspondante.

Tableau XIII : Pics du spectre MALDI expérimental correspondant aux peptides glycosylés de la MLC2s.

Masse expérimentale	Masse théorique	Peptide	Séquence en acides aminés
1445,6564	1079,5203	120-128	(R)EMLTTQAER(F)
1461,6349	1095,5152	120-128	(R)EMoxLTTQAER(F)
2412,0582	2046,3243	115-131	(K)ADYVREMLTTQAERFSK(E)
2428,1710	2062,3237	115-131	(K)ADYVREMOxLTTQAERFSK(E)
3058,2605	2692,0419	7-29	(K)KRLEGGSSNVFSMFQEQTIQEFK(E)
3074,6032	2708,0413	7-29	(K)KRLEGGSSNVFSMoxFEQEQTIQEFK(E)

Ainsi, le pic de masse 1445,6564 correspond au pic de masse 1079,5203 avec un incrément de masse de 366 daltons. La séquence du peptide correspondante est indiquée dans le tableau XIV. De la même manière, le pic de masse 1461,6349 correspond au pic de masse 1095,5152 avec un incrément de masse de 366 daltons. Dans les deux cas, il s'agit du même peptide, avec dans le second cas une méthionine oxydée (Met 121).

Deux autres pics ont été attribués de la même manière au peptide localisé en position 115 à 131 ; il s'agit des peptides de masse 2412,0582 et 2428,1710, qui correspondent respectivement aux peptides de masse 2046,3243 et 2062,3237, avec un incrément de masse de 366 Da et la présence d'une méthionine oxydée dans le second cas. D'autre part, le peptide de masse 2412,0582 comprend la séquence en acides aminés du peptide de masse 1445,6564, avec dans ce cas un clivage par la trypsine non réalisé au niveau de l'arginine 128.

Comme il est connu que la modification par la O-GlcNAc se fait au niveau de résidus de sérine ou de thréonine, il semblerait donc que la glycosylation au niveau de ce peptide puisse avoir lieu au niveau de la thréonine 123 ou de la thréonine 124. Il y a également un second peptide potentiellement glycosylé, de masse 3058,2605, localisé au début de la séquence protéique, avec les sérines 14, 15, 19 ou la thréonine 24. Tous ces sites potentiels sont représentés figure 63, mettant en évidence la localisation de ces sites au niveau de la séquence en acides aminés de la MLC2s. Les thréonine 123 et 124 sont localisées au niveau d'un motif « EF-hand » sensible au calcium.

Troisième partie – O-GlcNAc et protéines contractiles

1 11 21 31
SPKKAK**KRLE** **GGSSNVFSMF** **EQ**TQIQEF**KE** AFTIMDQNRD

41 51 61 71
GFIDKNDLRD TFAALGRVNV KNEEIDEMIK EAPGPINFTV

81 91 101 111
FLTMFGEK**KLK** **GADPEETILN** **AFK**VFDPE**GK** **GSLK**ADYVRE****

121 131 141 151
MLTTQAER**FS** **K**EEIDQM**FAA** **FPPDVTGNLD** **YK**NLVH**II**TH****

161
GEEKD****

Figure 63 : Séquence protéique de la MLC2s. En vert sont indiqués les peptides porteurs de O-GlcNAc et en rouge les sites potentiels de cette modification post-traductionnelle. Sont également indiqués les motif EF-hand, sensibles au calcium : *EF-hand 1* ; *EF-hand 2* ; *EF-hand 3*.

IV – Rôles de la O-GlcNAc dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires.

A – Pourquoi étudier les caractéristiques d'activation calcique ?

L'interaction actine-myosine est fortement régulée par les ions calcium. Cette régulation met en jeu des protéines régulatrices, en particulier les troponines et les chaînes légères de myosine. Certaines de ces protéines sont modifiées par la O-GlcNAc et portent une activité lectinique vis-à-vis de ce motif O-GlcNAc ; c'est en particulier le cas de la MLC2, connue pour modifier la sensibilité calcique des fibres musculaires. Il semble donc tout à fait possible que cette glycosylation puisse jouer un rôle dans l'activité contractile et en particulier pour la moduler.

Dans une première approche, nous avons décidé d'étudier l'effet de la O-GlcNAc sur les propriétés d'activation calcique de la fibre musculaire. Les caractéristiques d'activation calcique des fibres pelées 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

64). En effet, il est possible d'identifier le rôle modulateur de certaines protéines sur la contraction par l'étude des paramètres caractérisant la relation tension/pCa, qui traduit les propriétés d'activation calcique d'une fibre musculaire.

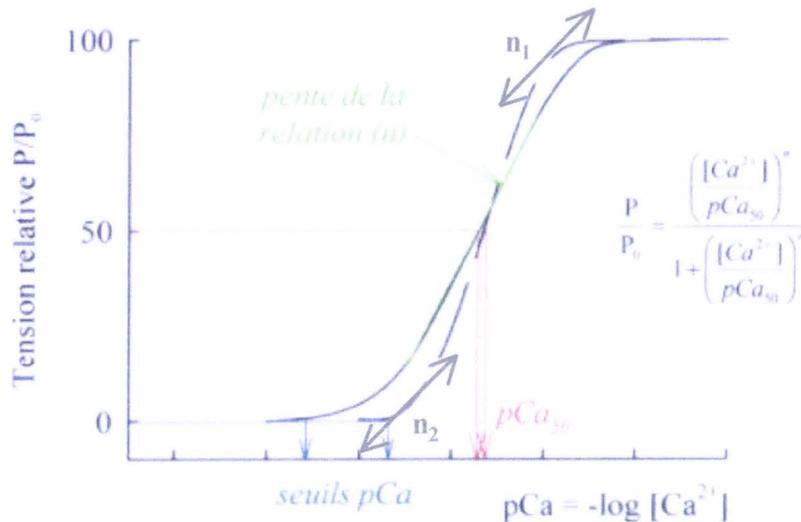


Figure 64 : Détermination des caractéristiques d'activation calcique avec la relation Tension/pCa d'une fibre lente (trait plein) et d'une fibre rapide (trait discontinu). La pente de la relation (vert) est ajustée à l'aide de l'équation de Hill (d'après Kischel , 2000).

Les relations T/pCa ont une allure sigmoïde. Trois paramètres sont nécessaires pour décrire les caractéristiques d'activation calcique :

- 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 ;
- 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 troponine C et les protéines régulatrices du filament fin.

Les relations Tension/pCa sont caractéristiques du type de fibre, et sont distinctes selon que l'on ait des fibres lentes ou des fibres rapides. Les fibres lentes ont un seuil d'activation inférieur (donc une meilleure sensibilité calcique du système contractile) par rapport aux fibres rapides, tandis que ces dernières présentent une coopérativité supérieure (car le

coefficient de Hill est plus élevé). Par ailleurs, selon ses états de phosphorylation, la MLC2 peut augmenter ou diminuer la sensibilité calcique de la fibre, ce qui va se traduire par un déplacement de la relation tension/pCa.

B - Rôles de la O-GlcNAc dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires

Afin d'étudier le rôle de la O-GlcNAc dans la contraction musculaire, deux approches ont été utilisées :

- la première a consisté à incuber des fibres musculaires dans une solution de N-acétyl-D-glucosamine, afin de lever les éventuelles interactions protéine-protéine mettant en jeu la O-GlcNAc ; en effet, si deux protéines interagissent entre elles grâce au motif O-GlcNAc, la présence de GlcNAc libre devrait permettre de lever l'interaction existant entre ces deux protéines ;
- l'autre fonction possible de la O-GlcNAc est un rôle modulateur de l'activité d'une protéine. Dans ce cas, le motif O-GlcNAc peut être libre et accessible, c'est-à-dire non engagé dans des interactions protéine-protéine. Dans ce cas, les fibres ont été incubées en présence de WGA, ce qui permettra de masquer le motif O-GlcNAc.

1 - Caractérisation de la glycosylation des biopsies

Les biopsies de soleus utilisées pour la mesure de la tension isométrique ont été prélevées deux à trois semaines avant leur utilisation. Dans de telles conditions, il nous fallait tout d'abord déterminer s'il n'y avait pas de perte de glycosylation après un mois mais également si la pelage chimique n'influe pas sur la O-GlcNAc. Pour ce faire, les protéines-O-GlcNAc ont été purifiées en « batch » sur billes de WGA puis analysées par SDS-PAGE 10-20%. Les résultats sont présentés figure 65. Les protéines fixées sur colonne avant élution par la N-acétyl-D-glucosamine sont représentées en A ; les protéines restant fixées sur les billes de WGA après élution GlcNAc sont représentées en B.

Comme l'illustre la figure 65-A, les profils protéiques des protéines-O-GlcNAc purifiées sur billes de WGA sont globalement identiques entre des biopsies pelées (puits 1 et 2) et un homogénat de soleus n'ayant subi aucun traitement (puits 3). Le pelage chimique n'influe donc pas sur le taux de glycosylation des protéines musculaires. Par ailleurs, le profil

est également similaire entre les biopsies de deux (puits 1) et quatre semaines (puits 2) ; il n'y a donc pas de perte de glycosylation au cours du temps.

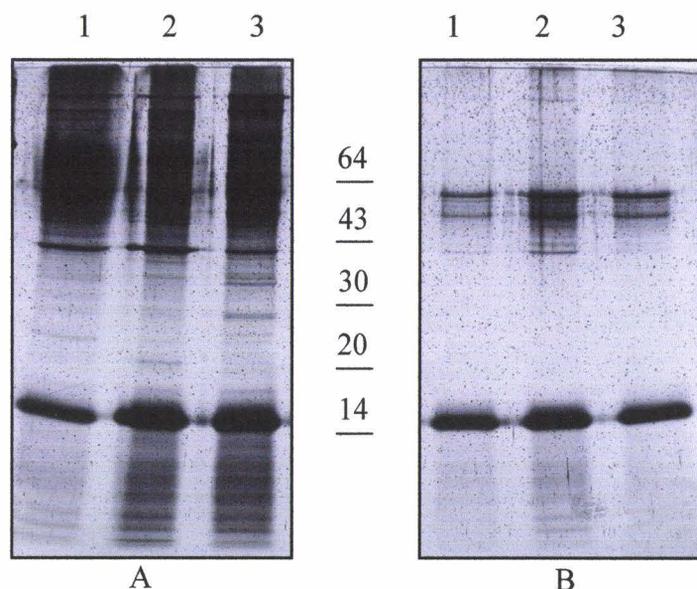


Figure 65 : SDS-PAGE 10-20 % de protéines musculaires O-GlcNAc fixées sur billes de WGA (en A) ou protéines musculaires restant fixées sur les billes après une élution par 0,2 M de N-acétylglucosamine (en B).

(1) biopsie pelée de deux semaines ; (2) biopsie pelée de quatre semaines ; (3) homogénat de soleus.

De plus, la figure 65-B représente les protéines restant fixées sur les billes de WGA après une élution par 0,2 M de GlcNAc. Cette figure met en évidence que les protéines purifiées sur les billes de WGA sont spécifiquement fixées sur la colonne de lectine par l'intermédiaire du motif de N-acétylglucosamine, puisque la plupart des protéines sont éluées par 0,2 M de GlcNAc.

2 - Détermination de la concentration de N-acétylglucosamine à utiliser pour lever les interactions protéine-protéine dépendante de la O-GlcNAc.

Des protéines musculaires ont été purifiées en « batch » sur billes de GlcNAc-immobilisées. Les protéines présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif O-GlcNAc ont ainsi été purifiées en se fixant sur les billes de N-acétylglucosamine. L'incubation de ces billes en présence de concentrations variables de GlcNAc (de 0,05 à 0,5 M) nous permettra de

déterminer la concentration de GlcNAc nécessaire pour lever l'interaction des protéines vis-à-vis des billes de O-GlcNAc, et donc d'éventuelles interactions protéine-protéine mettant en jeu ce motif.

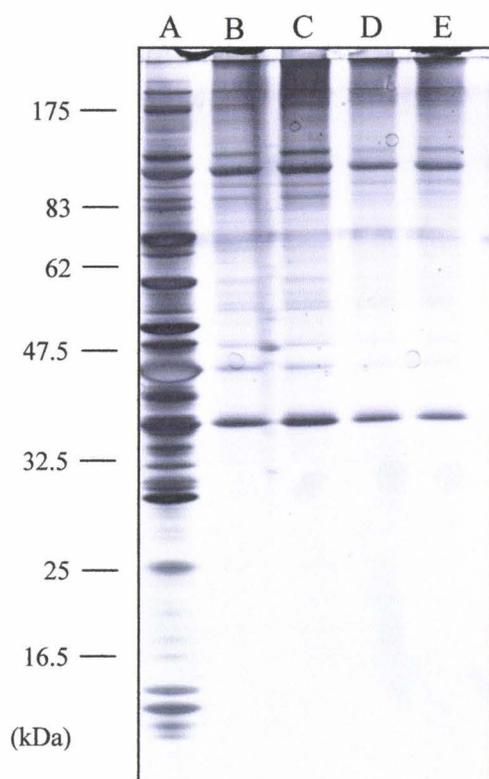


Figure 66 : SDS-PAGE 10-20% de protéines musculaires purifiées sur billes de GlcNAc-immobilisées. Protéines totales en (A) ; Protéines fixées sur billes de GlcNAc en (B) ; Protéines restant fixées sur les billes de GlcNAc après élution par 0,05 M de GlcNAc en (C), 0,2 M de GlcNAc en (D) ou 0,5 M de GlcNAc en (E).

Comme l'indique la figure 66-B, un certain nombre de protéine portent une activité lectinique à O-GlcNAc. Il n'y aucune levée d'interaction en présence de 0,05 M de GlcNAc (figure 66-C), puisque les profils protéiques sont similaires entre les puits B et C. En revanche, on note une perte assez importante de protéines dans le puits D, ce qui signifie que les lectines à O-GlcNAc sont éluées des billes de GlcNAc en présence de 0,2 M de GlcNAc. Par ailleurs, il n'y a pas de différence de profil entre les puits D et E, ce qui montre que la GlcNAc à 0,5 M, concentration couramment utilisée en chromatographie d'affinité faisant intervenir des lectines, n'élué pas plus de protéines que la GlcNAc à 0,2 M.

La concentration de 0,2 M de GlcNAc sera donc la concentration utilisée pour nos études relations tension/pCa.

3 - Effet de l'hyperosmolarité sur la sensibilité calcique

Nous avons déterminé précédemment qu'une concentration à 0,2 M en GlcNAc était

suffisante pour lever *in vitro* les interactions dépendantes de la GlcNAc. Il faut cependant déterminer les effets propres de l'hyperosmolarité ; une solution hypertonique de 0,2 M de glycérol a donc été testée sur les propriétés contractiles des fibres musculaires, d'abord en simple puis en double application. Les relations tension/pCa obtenues sont représentées figure 67. Les différents paramètres obtenus à partir des relations tension/pCa (seuil d'activation calcique, pCa_{50} et coefficients de Hill n_1 et n_2) déterminés après une et deux incubations dans une solution de glycérol, et à chaque fois pour sept fibres, sont regroupés dans le tableau XIV.

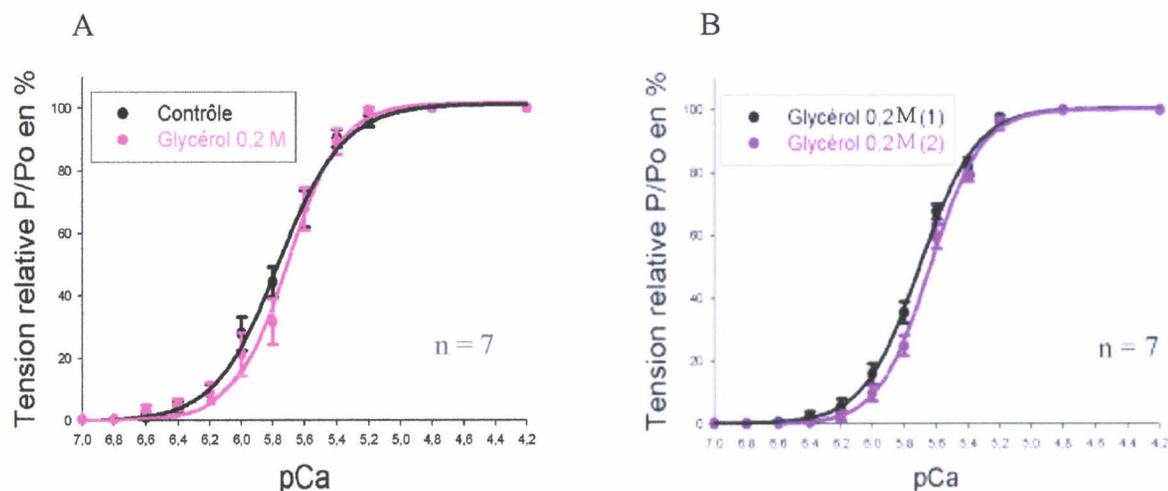


Figure 67 : Relation T/pCa des fibres musculaires obtenue après une incubation unique d'une heure (en A) ou après deux incubations successives d'une heure (en B) dans une solution de glycérol 0,2 M.

Tableau XIV : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de sept fibres musculaires après une et deux incubations dans une solution de glycérol 0,2 M.

UNE INCUBATION DANS LE GLYCEROL 0,2 M							
Contrôle				Glycérol 0,2 M			
Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2	Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2
$6,45 \pm 0,06$	$5,77 \pm 0,04$	$2,51 \pm 0,30$	$2,74 \pm 0,51$	$6,32 \pm 0,08$	$5,69 \pm 0,05$	$2,08 \pm 0,32$	$3,79 \pm 1,09$
DEUX INCUBATIONS DANS LE GLYCEROL 0,2 M							
Glycérol 0,2 M (incubation 1)				Glycérol 0,2 M (incubation 2)			
Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2	Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2
$6,42 \pm 0,03$	$5,69 \pm 0,03$	$2,24 \pm 0,20$	$2,75 \pm 0,14$	$6,29 \pm 0,06$	$5,65 \pm 0,03$	$3,04 \pm 0,25$ *	$2,24 \pm 0,17$ *

* $p < 0,05$; n_1 , n_2 glycérol 0,2 M (deuxième incubation) vs (première incubation).

Après une incubation d'une heure dans une solution de glycérol 0,2 M, les valeurs du seuil d'activation ainsi que les valeurs de pCa_{50} ne sont pas modifiées. Les valeurs des coefficients de Hill restent également inchangés (figure 67-A). Il n'y a donc aucun effet significatif d'une solution hypertonique à 0,2 M de glycérol sur les propriétés d'activation calcique de la fibre squelettique.

Après deux incubations successives d'une heure dans une solution de glycérol 0,2 M, les valeurs du seuil d'activation et les valeurs de pCa_{50} ne sont pas modifiées, donc ni la sensibilité ni l'affinité calciques ne sont modifiées (figure 67-B). En revanche, les coefficients de Hill, et donc la coopérativité au sein du filament fin, sont modifiés lorsqu'on augmente l'osmolarité du milieu.

4 – Influence de la GlcNAc sur les valeurs P et P_0 .

Afin de déterminer la fonction de la GlcNAc au niveau des fibres musculaires, il fallait également vérifier que le monosaccharide n'avait aucun effet sur les tensions maximales. Différentes mesures des tensions P par rapport aux tensions maximales P_0 ont donc été effectuées ; ces résultats sont illustrés figure 68.

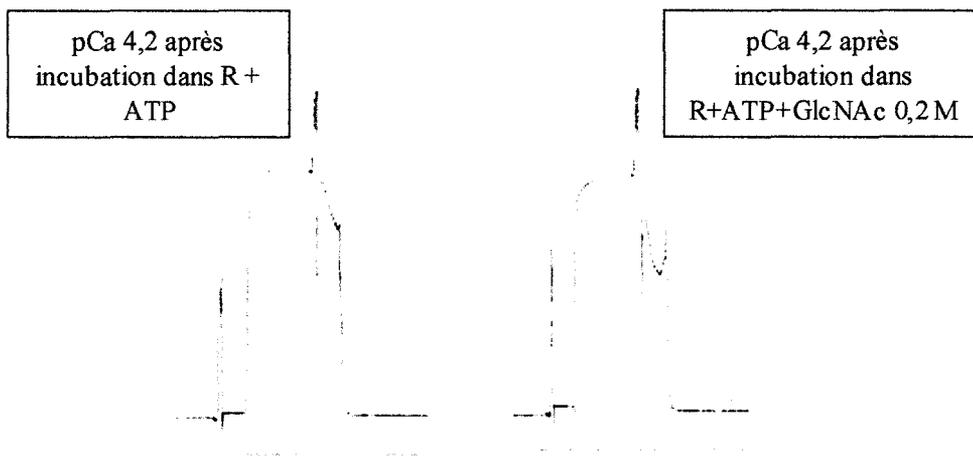


Figure 68 : Mesures des tensions sous-maximales P et maximales P_0 après une incubation de la fibre musculaire dans une solution de 0,2 M GlcNAc ($n = 3$).

L'incubation de la fibre en présence de N-acétylglucosamine ne modifie donc pas la tension maximale développée par la fibre.

5 - Effet de la O-GlcNAc sur la sensibilité calcique.

Nous avons préalablement montré que 0,2 M de GlcNAc suffisait à lever les interactions protéine-protéine mettant en jeu une activité lectinique vis-à-vis du motif O-GlcNAc, qu'une solution hyperosmotique n'a pas d'influence sur les propriétés d'activation calcique et que la N-acétylglucosamine ne modifie pas le tension maximale développée par la fibre. L'étude de l'effet de 0,2 M de N-acétylglucosamine sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires est illustré figure 69 : les relations T/pCa ont été obtenues à partir de onze fibres musculaires.

Les valeurs de seuil d'activation calcique, la pCa_{50} , les coefficients de Hill déterminés après une incubation dans une solution de 0,2 M de N-acétyl-D-glucosamine sont indiquées dans le tableau XV. Les valeurs de pCa_{50} sont déterminées pour chaque fibre, la valeur reportée dans les tableaux correspondant à la valeur moyenne \pm SEM.

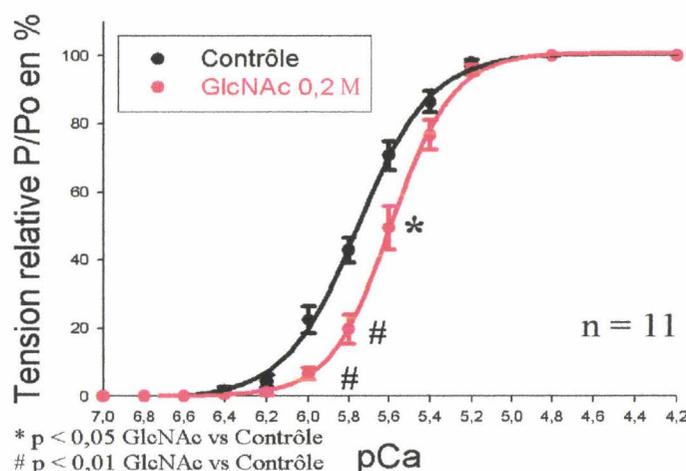


Figure 69 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

Tableau XV : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de onze fibres musculaires après une incubation dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

UNE INCUBATION DANS LA GlcNAc 0,2 M							
Contrôle				GlcNAc 0,2 M			
Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2	Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2
$6,55 \pm 0,04$	$5,77 \pm 0,03$	$3,67 \pm 0,43$	$2,60 \pm 0,26$	$6,30 \pm 0,05$	$5,59 \pm 0,04$ #	$3,08 \pm 0,33$	$2,56 \pm 0,24$

$p < 0,01$ pCa_{50} GlcNAc 0,2 M vs pCa_{50} contrôle.

L'incubation des fibres musculaires dans une solution à 0,2 M de GlcNAc entraîne un déplacement significatif de la courbe vers la droite. Les valeurs du seuil d'activation et de la pCa_{50} sont augmentées, traduisant une diminution de la sensibilité et de l'affinité calciques de la fibre musculaire. 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.

Afin de démontrer que la modification des propriétés d'activation calcique (notamment l'affinité et la sensibilité calciques) était liée à la N-acétyl-D-glucosamine et à elle seule, nous avons entrepris la même étude en présence d'un autre monosaccharide. Nous avons donc étudié les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires lors d'une incubation en présence d'une autre hexosamine acétylée, se différenciant de la GlcNAc par une épimérisation au niveau du carbone 4 : la N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc).

Les relations tension/ pCa déterminées après une heure d'incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M sont représentées figure 70, et les valeurs de seuil d'activation calcique, la pCa_{50} , et les coefficients de Hill correspondant sont indiquées dans le tableau XVI. Ces résultats sont représentatifs de trois fibres.

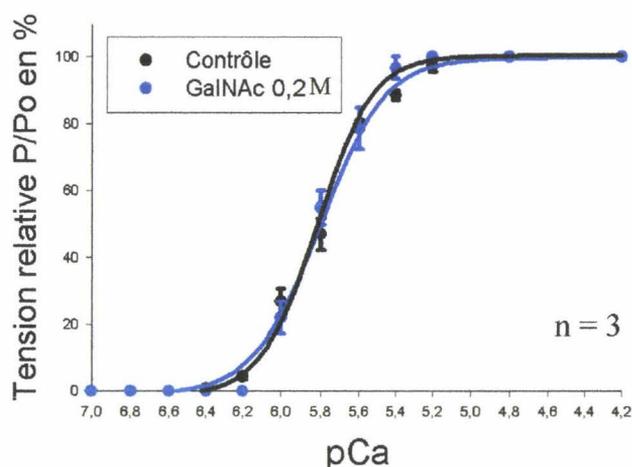


Figure 70 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M.

Comme le montre la figure 70 ainsi que les valeurs du seuil d'activation, de la pCa_{50} et des coefficients de Hill du tableau XVI, l'application d'une solution de GalNAc à 0,2 M ne produit aucun effet ni sur les propriétés d'activation calcique de la fibre musculaire, ni sur la coopérativité au sein du filament fin.

Tableau XVI : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de trois fibres musculaires après une incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M.

UNE INCUBATION DANS LA GalNAc 0,2 M							
Contrôle				GalNAc 0,2 M			
Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2	Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2
$6,53 \pm 0,04$	$5,86 \pm 0,05$	$3,62 \pm 0,48$	$2,13 \pm 0,45$	$6,42 \pm 0,01$	$5,81 \pm 0,03$	3,57	$2,98 \pm 0,16$

Afin de compléter cette étude, nous avons entrepris de déterminer les relations tension/ pCa après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M. Les résultats obtenus, représentatif de quatre fibres, sont indiqués figure 71 et tableau XVII.

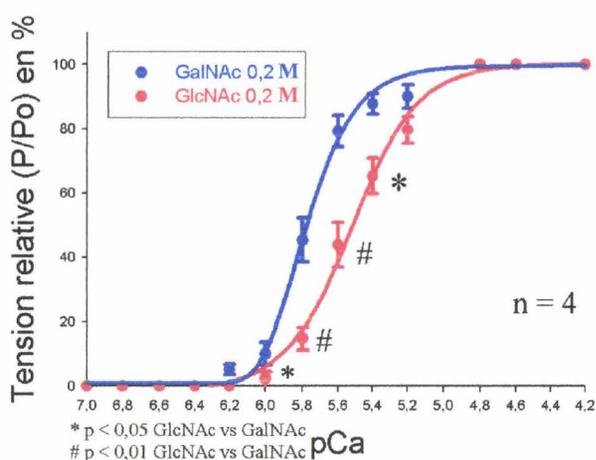


Figure 71 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

L'application d'une solution de GlcNAc suite à une incubation dans une solution de GalNAc induit un shift significatif de la relation tension/ pCa caractérisé par une augmentation de la pCa_{50} .

Tableau XVII : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de quatre fibres musculaires après une incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation dans une solution de GlcNAc 0,2M.

DEUX INCUBATIONS SUCCESSIVES GalNAc/GlcNAc							
GalNAc 0,2 M				GlcNAc 0,2 M			
Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2	Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2
$6,38 \pm 0,04$	$5,81 \pm 0,05$	$3,75 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,08$	$6,30 \pm 0,03$	$5,56 \pm 0,05$ *	$2,91 \pm 0,36$	$1,48 \pm 0,24$

* $p < 0,05$ pCa_{50} GlcNAc 0,2 M vs pCa_{50} GalNAc 0,2 M.

Nous avons vu précédemment que l'incubation des fibres musculaires dans une solution de N-acétyl-D-glucosamine induit une diminution de la sensibilité et de l'affinité calcique de la fibre musculaire sans affecter la coopérativité au sein du filament fin, alors que l'incubation dans une solution de N-acétyl-D-galactosamine n'a aucun effet sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires. L'incubation des fibres dans une solution de GalNAc suivie d'une incubation dans une solution de GlcNAc induit une diminution de la sensibilité et de l'affinité calcique de la fibre musculaire, sans modifier la coopérativité au sein du filament fin. Il s'avère donc que les modifications des propriétés calciques des fibres musculaires sont donc spécifiquement modifiées en présence de GlcNAc et semblerait liées à des interactions protéiques *via* le motif O-GlcNAc.

6 - Profil électrophorétique des fibres incubées en présence de glycérol, de GalNAc ou de GlcNAc.

L'incubation des fibres musculaires en présence d'une solution de N-acétyl-D-glucosamine induit des modifications des propriétés d'activation calciques de la fibre musculaire. Afin de contrôler l'intégrité du profil électrophorétique des fibres musculaires incubées en présence de GlcNAc, par comparaison avec celles incubées en présence de glycérol ou de GalNAc, nous avons réalisé une analyse de leur composition en protéines par SDS-PAGE 10-20% et coloration au nitrate d'argent. Les résultats obtenus sont représentés figure 72.

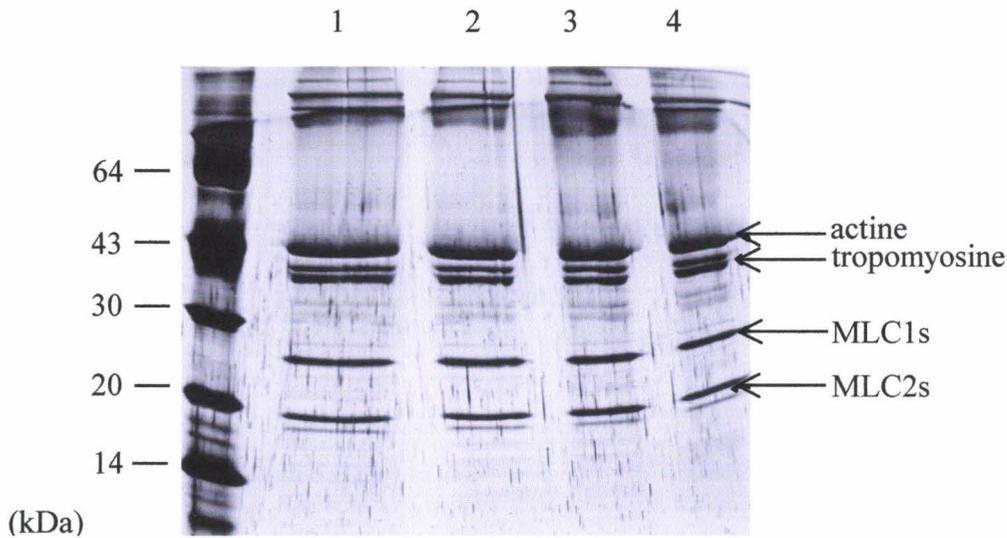


Figure 72 : Profil électrophorétique de fibres musculaires contrôle (en 1), ou incubées dans une solution de GalNAc 0,2 M (en 2), de GlcNAc 0,2 M (en 3) ou de glycérol 0,2 M (en 4).

Le profil électrophorétique est similaire entre les fibres contrôles et les fibres incubées en présence de glycérol, de GalNAc ou de GlcNAc. Il n'y a donc aucune perte détectable de protéines au niveau des fibres musculaires après incubation dans une solution de glycérol, de GalNAc ou de GlcNAc.

7 - Rôles des motifs O-GlcNAc libres sur la sensibilité calcique

Si des motifs O-GlcNAc sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, la levée de ces interactions (par exemple par incubation dans une solution de N-acétyl-D-glucosamine) pourrait moduler l'activité contractile des fibres musculaires squelettiques. Au contraire, il peut exister certains motifs O-GlcNAc dits « libres », c'est-à-dire non engagés dans des interactions protéiques, qui peuvent eux aussi moduler l'activité et les propriétés des protéines ainsi modifiées.

L'objectif de cette étude est d'étudier les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires après avoir masqué le motif O-GlcNAc « libre ». Nous avons entrepris d'étudier les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires en présence de WGA à une concentration de 0,1 mg/ml sur les propriétés contractiles de la fibre isolée. Le choix de cette concentration en WGA a été faite en accord avec les rares références bibliographiques testant

la neutralisation d'un motif O-GlcNAc par l'utilisation de cette lectine (Finlay et coll., 1987).

La relation tension/pCa résultante de cette étude est représentée figure 73, et les valeurs de seuil d'activation calcique, la pCa_{50} , et les coefficients de Hill représentatives de deux fibres sont indiquées dans le tableau XVIII.

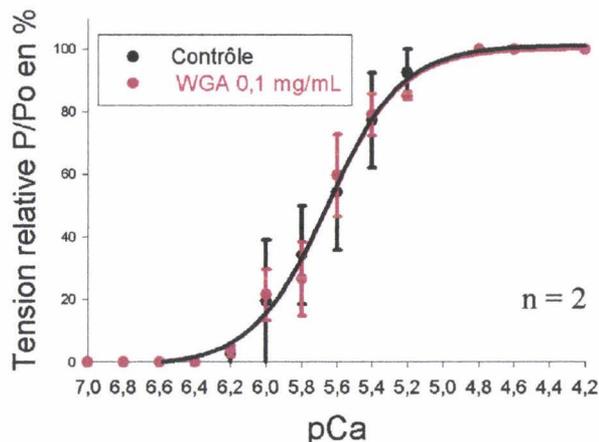


Figure 73 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de WGA à 0,1 mg/ml.

Tableau XVIII : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de deux fibres musculaires après une incubation dans une solution de WGA 0,1 mg/ml.

UNE INCUBATION DANS LA WGA 0,1 mg/ml							
Contrôle				WGA 0,1 mg/ml			
Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2	Seuil	pCa_{50}	n_1	n_2
$6,40 \pm 0,03$	$5,64 \pm 0,17$	$2,57 \pm 0,57$	2,13	$6,40 \pm 0,03$	$5,77 \pm 0,18$	$2,84 \pm 1,05$	$2,10 \pm 0,27$

Comme l'indiquent les résultats de la figure 73 et du tableau XVIII, ni le seuil d'activation calcique, ni la pCa_{50} , ni les coefficients de Hill ne semblent modifiés. L'application de 0,1 mg/ml de WGA n'a donc aucun effet sur les propriétés d'activation calcique et sur la coopérativité au sein des filaments fins.

V – Discussion.

Nous avons démontré au cours de notre travail qu'un certain nombre de protéines contractiles sont modifiées par la O-GlcNAc ; il s'agit en particulier de la chaîne lourde de myosine (Cieniewski-Bernard et coll., 2004), ainsi que l'actine, la tropomyosine et les chaînes légères de myosine (essentielle et régulatrice). Ces résultats ont été obtenus après purification des protéines contractiles sur colonne de WGA-immobilisée. La nature O-N-acétylglucosaminylée de ces protéines a également été confirmée par chromatographie en phase gazeuse (GC et GC-MS), grâce à l'analyse des alditoles acétates libérés des protéines d'intérêt par β -élimination en milieu réducteur.

L'analyse des protéines contractiles présentant des propriétés lectiniques vis-à-vis du motif O-GlcNAc a permis d'identifier par l'intermédiaire de leur empreinte peptidique obtenue par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF les chaînes lourdes et légères de myosine, ainsi que l'actine. La tropomyosine, bien que facilement identifiable sur le gel d'électrophorèse selon sa masse moléculaire, n'a pas été identifiée avec succès selon cette méthodologie. La faible expression des protéines régulatrices (troponines), non visualisables par coloration classique des gels d'électrophorèse, nous conduira à utiliser ultérieurement une autre méthodologie afin de mettre en évidence la nature glycosylée des troponines (TnT, TnI et TnC) ainsi que leur propriétés lectiniques vis-à-vis du motif O-GlcNAc. La figure 74 représente schématiquement les protéines contractiles O-GlcNAc et portant une activité lectinique vis-à-vis de la O-GlcNAc.

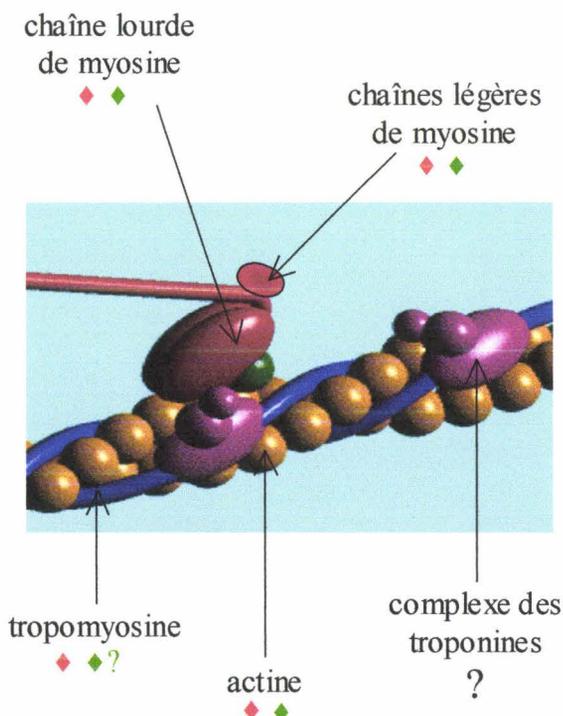


Figure 74 : Schéma représentant l'interaction entre le filament épais et la filament fin. Le motif \blacklozenge représente les protéines-O-GlcNAc et le motif \blacklozenge les protéines présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif O-GlcNAc.

Il est à noter que certaines de ces protéines sont des phosphoprotéines. La chaîne légère régulatrice MLC2 peut être phosphorylée *in vivo* par la MLCK ou "myosin light chain kinase". Celle-ci dépend d'une protéine activatrice, elle-même dépendante du calcium : la calmoduline. La phosphorylation de la MLC2 en présence de MLCK et de calmoduline augmente la sensibilité au calcium de myofilaments pelés de muscle psoas (Persechini et coll., 1985).

La Tm est également une phosphoprotéine (Watson et coll., 1988). La phosphorylation de la Tm au niveau de la sérine 283 pourrait exercer plusieurs fonctions, telles que la polymérisation du filament de tropomyosine, dans l'interaction Tm-TnT voire Tm-actine (Watson et coll., 1988 ; Sano et coll., 2000). Or, la tropomyosine et la MLC2 sont aussi des protéines modifiées par la *O*-GlcNAc et semblent porter une activité lectinique vis-à-vis de la *O*-GlcNAc. On pourrait donc penser qu'une balance phosphorylation/*O*-GlcNAc puisse moduler l'activité et le rôle des protéines ainsi modifiées, voire intervenir dans des processus de polymérisation, en particulier dans le cas de la tropomyosine. En effet, l'existence d'un aussi grand nombre de protéines contractiles à la fois dotées d'une activité lectinique vis-à-vis de la *O*-GlcNAc et modifiées par la *O*-GlcNAc nous laisse supposer que cette glycosylation puisse intervenir dans les nombreuses interactions protéine-protéine du filament fin. Ainsi, la *O*-GlcNAc pourrait par exemple intervenir dans la polymérisation du filament de tropomyosine et/ou d'actine, ou alors intervenir dans la reconnaissance et l'interaction d'autres protéines (par exemple l'interaction MHC-MLC ou encore l'interaction entre l'actine et la tropomyosine).

Outre l'identification des protéines contractiles portant un motif *O*-GlcNAc ainsi que des lectines reconnaissant ce motif, nous avons également entrepris d'étudier les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires afin de déterminer si la *O*-GlcNAc pourrait modifier la physiologie contractile. En effet, le grand nombre de protéines contractiles *O*-GlcNAc et/ou lectines à *O*-GlcNAc nous suggère que la *O*-GlcNAc puisse exercer une fonction importante dans les différentes interactions protéine-protéine qui régissent la contraction musculaire. La levée des interactions protéine-protéine dépendantes de ce motif *O*-GlcNAc pourrait se faire par incubation de fibres musculaires en présence de N-acétyl-D-glucosamine. Nos résultats montrent que la N-acétyl-glucosamine entraîne 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. Une telle diminution de la sensibilité calcique pourra se traduire par une perte de force. 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 coll., 1996). La troponine C, impliquée dans la modulation de la pCa_{50} , pourrait également intervenir dans la diminution de la sensibilité calcique observée en présence de GlcNAc. Il serait ainsi nécessaire de déterminer si cette protéine est modifiée par la O-GlcNAc et/ou si elle présente une activité lectinique vis-à-vis de ce motif.

Nos travaux concernant la MLC2 ouvrent de nouvelles perspectives quant à la fonctionnalité de cette glycosylation sur cette chaîne légère de myosine. Les chaînes légères de myosine régulatrices sont localisées au niveau de la jonction tête-queue des MHC, stabilisant la partie charnière de la MHC (Houdusse et coll., 1996) (figure 75). Ces MLC2 sont liées de manière non covalente à la molécule de MHC, et seraient impliquées dans la cinétique des cycles des ponts actine-myosine.

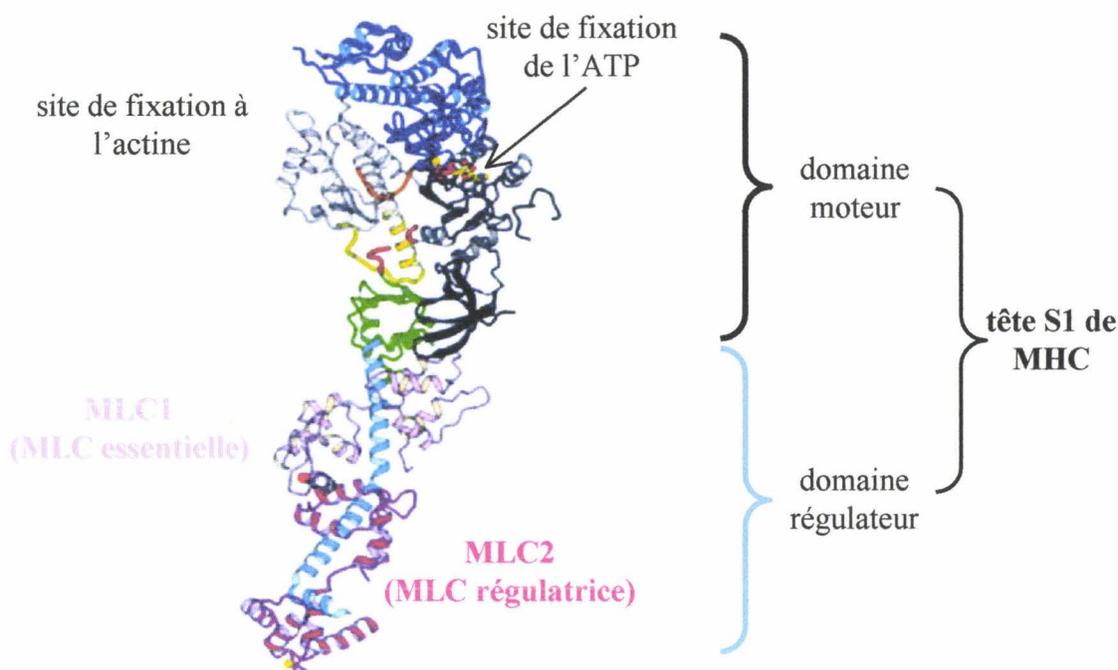


Figure 75 : Représentation schématique de la MLC2 au niveau de la structure du domaine régulateur de la tête S1 de la MHC (d'après Houdusse et coll., 1996).

En effet, il a été démontré que le domaine de liaison des MLC2 aux MHC subit des changements conformationnels d'inclinaison et de torsion pouvant jouer un rôle important dans la génération de force (Ritz-Gold et coll., 1980 ; Rayment et coll., 1993a ; Rayment et coll., 1993b ; Uyeda et coll., 1996). 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 coll.,

1973). Dans le muscle squelettique de rat, les sites de phosphorylation de la MLC2 se situent au niveau de résidus de sérine situés en position N-terminale, en particulier la sérine 14 pour l'isoforme lente et la sérine 15 pour l'isoforme rapide (Blumenthal & Stull, 1980).

La phosphorylation de la MLC2 aurait plusieurs effets sur les fibres musculaires. D'une part, elle augmenterait la sensibilité calcique (décalage vers la gauche de la relation tension/pCa) des fibres musculaires (Metzger et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1993 ; Szczesna et coll., 2002). D'autre part, des études cristallographiques ont montré que lorsque la MLC2 est phosphorylée, il existe une réorganisation des myofilaments par rapport à leur état de repos en condition non-phosphorylée. Les têtes de myosine seraient enfermées dans le filament fin en condition MLC2-phosphorylée, ce qui augmenterait l'intensité de l'interaction actine-myosine lors du retour à de faibles concentrations calciques.

D'une part, nos résultats concernant la détermination des sites de *O*-GlcNAc de la MLC2 montre que l'un des sites potentiels de glycosylation correspond à un site de phosphorylation au niveau de la sérine 14 (pour l'isoforme lente), et nous indique donc qu'il puisse exister une balance phosphorylation/*O*-GlcNAc au niveau de la MLC2, qui influencerait sur l'activité modulatrice de la protéine. D'autre part, nous démontrons par nos travaux que l'incubation des fibres en présence de N-acétylglucosamine conduit à une diminution de la sensibilité calcique ; cet effet n'est observable que si la MLC2 est sous forme glycosylée, puisque dans le cas contraire, il ne pourrait pas y avoir de levée d'interaction protéine-protéine dépendante de la *O*-GlcNAc. Cette glycosylation peut concerner les deux peptides potentiellement porteurs de la *O*-GlcNAc décrits dans notre travail, puisqu'il est connu que différents états de phosphorylation de la MLC2 co-existent au sein d'une fibre musculaire (Szczesna et coll., 2002). La compréhension de la fonctionnalité de la *O*-GlcNAc dans le processus contractile se fera *via* l'identification des sites de *O*-GlcNAc des autres protéines contractiles. La technique que nous avons utilisée dans notre étude afin d'identifier le site de *O*-GlcNAc, basée sur le marquage du motif *O*-GlcNAc par un résidu de galactose, nous a permis d'identifier deux peptides potentiellement porteurs de cette modification post-traductionnelle. Afin de déterminer précisément les sites modifiés par la *O*-GlcNAc, nous envisageons d'utiliser une autre méthodologie (technique BEMAD).

L'analyse électrophorétique des fibres musculaires incubées en présence de N-acétylglucosamine montrent qu'il n'y a pas de perte protéique après incubation dans une solution de GlcNAc. Il est cependant concevable que la MLC2 continue 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 coll., 1993a ; Rayment et coll., 1993b)), tandis qu'un autre type d'interaction, cette fois dépendant de la *O*-GlcNAc, soit levé en présence de la *N*-acétylglucosamine.

Ainsi, nos résultats démontrent que la *O*-*N*-acétylglucosaminylation joue un rôle dans l'activité contractile du muscle squelettique. Des protéines clé de la contraction et de la régulation de la contraction par le calcium sont modifiées par la *O*-GlcNAc et portent une activité lectinique vis-à-vis de ce monosaccharide. La levée d'interaction mettant en jeu la *O*-GlcNAc diminue la sensibilité calcique des fibres musculaires. L'analyse de la glycosylation de la MLC2 démontre que cette protéine régulatrice pourrait être impliquée dans l'effet de la *O*-GlcNAc sur la sensibilité calcique. D'autre part, l'analyse des sites de glycosylation de cette protéine semble indiquer qu'un phénomène de balance glycosylation/phosphorylation pourrait exister pour cette protéine et être d'importance dans l'activité modulatrice de cette protéine lors de l'interaction actine-myosine.

*Conclusion
générale
et
perspectives*

Ce travail de thèse a porté sur l'étude d'un type particulier de glycosylation, la *O*-N-acétylglucosaminylation, dans le muscle squelettique. Ce travail est particulièrement novateur puisqu'il n'existait jusqu'alors aucune publication concernant l'étude de la fonction de la *O*-GlcNAc au sein du tissu musculaire. Les seules études réalisées jusqu'alors concernaient l'étude de la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique en tant que tissu insulino-dépendant. Pourtant, l'étude de la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique est d'un grand intérêt, puisque la *O*-GlcNAc, dépendante du taux de glucose et de la phosphorylation, devrait jouer un rôle important dans ce tissu dont le métabolisme dépend fortement du glucose, et pour lequel de nombreux processus, tels que la contraction, dépendent de la phosphorylation. Par ailleurs, les fibres musculaires squelettiques sont des entités capables d'« ajuster » leur phénotype aux conditions extérieures, cette plasticité se traduisant par des modifications biochimiques et fonctionnelles. En particulier, dans le modèle d'hypodynamie-hypokinésie, il existe une transition d'un métabolisme initialement oxydatif en un métabolisme glycolytique dans les muscles lents posturaux. Or, l'hypothèse d'une intervention de la *O*-GlcNAc dans des changements métaboliques a déjà été émise dans le cas de l'effet « crabtree » des cellules tumorales, pour lesquelles le métabolisme glycolytique est altéré. Il semblait donc légitime d'étudier les variations de glycosylation dans le muscle squelettique lors du modèle d'hypodynamie-hypokinésie, dans lequel le métabolisme est altéré au sein du muscle lent atrophié.

Ce travail s'est articulé en trois grandes parties : la première partie de nos recherches a consisté en une identification des protéines-*O*-GlcNAc dans le muscle squelettique par approche protéomique, afin d'identifier certaines protéines d'intérêt portant le motif *O*-GlcNAc. La seconde partie de notre travail a eu pour but de déterminer si la *O*-GlcNAc pouvait être impliquée dans le processus d'atrophie musculaire induite par l'hypodynamie-hypokinésie. Enfin, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la fonction de cette modification post-traductionnelle au sein d'un mécanisme fondamental du muscle squelettique : la contraction musculaire.

I – *O*-GlcNAc et métabolisme musculaire.

La première partie de notre travail s'est attachée à l'identification d'un certain nombre de protéines modifiées par la *O*-GlcNAc. En particulier, nous avons démontré que la *O*-GlcNAc pouvait être impliquée dans un grand nombre de processus fonctionnels du muscle

squelettique, notamment au niveau des voies de régénération de l'ATP permettant le maintien de la contraction musculaire. En effet, il existe différents moyens de régénération de l'ATP afin de maintenir le mécanisme de contraction :

- la voie anaérobie alactique permettant une régénération rapide de l'ATP. C'est dans cette voie que l'on retrouve la créatine kinase et l'adénylate kinase, enzymes toutes deux modifiées par la *O*-GlcNAc ;
- la voie anérobie lactique, en particulier la voie glycolytique conduisant à la formation d'acide lactique. La *O*-GlcNAc modifie un grand nombre d'enzymes de cette voie, telles que la fructose bisphosphatase aldolase, la triose phosphate isomérase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la phosphoglycérate kinase, la β -énolase, la pyruvate kinase ou encore la lactate déshydrogénase ;
- la filière aérobie, avec la modification de l'aconitase, enzyme du cycle de Krebs, ainsi que des enzymes permettant la régénération du cycle (malate déshydrogénases cytosolique et mitochondriale).

La *O*-GlcNAc participerait donc aux voies métaboliques du muscle squelettique. Il est aujourd'hui admis que la *O*-GlcNAc puisse être un senseur nutritionnel du taux glucose ; elle pourrait donc exercer une régulation métabolique en fonction des besoins énergétiques du muscle, tissu insulino-dépendant dont le métabolisme dépend fortement du taux de glucose sanguin et du glucose cellulaire.

De plus, il semble qu'il puisse exister une balance phosphorylation/*O*-N-acétylglucosaminylation au niveau de certaines enzymes glycolytiques. En effet, nos travaux ont montré que des enzymes du métabolisme énergétique telles que la β -énolase, la fructose-bisphosphatase aldolase ou encore la créatine kinase existent sous forme d'isoformes, pouvant correspondre à des isoformes de phosphorylation, chacune de ces formes étant également glycosylée.

Il serait donc intéressant de déterminer la fonction de la *O*-GlcNAc au niveau des voies métaboliques, en particulier au niveau de la voie glycolytique. Cette étude pourra être réalisée sur des cultures de myotubes. Après traitement des myotubes avec l'inhibiteur de la *O*-GlcNAc transférase (alloxan) ou avec un inhibiteur de la *O*-GlcNAcase (PUGNAc), différents dosages de certaines activités enzymatiques pourront alors être réalisés, afin de déterminer si l'augmentation du taux de *O*-GlcNAc (lors du traitement à la PUGNAc) ou la diminution du taux de *O*-GlcNAc (lors du traitement à l'alloxan) influe sur les différents flux métaboliques. L'objectif de ce travail sera de corrélérer une augmentation de la modification

(ou une diminution selon l'inhibiteur utilisé) par la *O*-GlcNAc des différentes enzymes de la voie glycolytique avec une augmentation ou une diminution du flux glycolytiques.

II – *O*-GlcNAc et atrophie induite par hypodynamie-hypokinésie.

Ce travail a également permis l'identification de marqueurs impliqués dans la plasticité musculaire et dans l'adaptation phénotypique du muscle à de nouvelles conditions physiologiques en tant que protéines modifiées par la *O*-GlcNAc. Il s'agit en particulier des chaînes lourdes de myosine, de la créatine kinase, de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, de l' α B-cristalline, de l'anhydrase carbonique III et de la β -énolase.

Nous avons également montré dans la seconde partie de notre travail qu'il existe une corrélation entre les variations du taux global de *O*-GlcNAc et le développement de l'atrophie induite par hypodynamie-hypokinésie. En effet, on observe dans le soleus une diminution du taux global de *O*-GlcNAc, accompagnant la perte de masse du soleus, tandis que le taux de *O*-GlcNAc augmente dans l'EDL, muscle rapide peu modifié après hypodynamie-hypokinésie. Ces variations du taux de *O*-GlcNAc peuvent être directement corrélées aux variations d'activité des deux enzymes du cycle glycosylation/déglycosylation ; en effet, la diminution du taux de *O*-GlcNAc observée dans le soleus après hypodynamie-hypokinésie s'accompagne d'une diminution de l'activité *O*-GlcNAc transférase et d'une augmentation de l'activité *O*-GlcNAcase. Inversement, il y a augmentation de l'activité *O*-GlcNAc transférase dans l'EDL, conduisant à une augmentation du taux de *O*-GlcNAc dans le muscle rapide après hypodynamie-hypokinésie.

Nos travaux mettent en évidence une corrélation entre les variations d'expression de la protéine de choc thermique de 70 kDa, HSP70, et les variations du taux de *O*-GlcNAc. Nous avons en effet montré dans ce travail que l'augmentation du taux de *O*-GlcNAc est associée à une augmentation d'expression de HSP70 dans l'EDL, qui n'est pas touché par l'atrophie de non-utilisation. Or, des travaux récents ont démontré l'existence d'un mécanisme de protection des cellules contre différents types de stress *via* une augmentation du taux de *O*-GlcNAc et *via* les protéines de choc thermique HSP70 et HSP40, chaperons moléculaires impliqués dans la protection et la remise en conformation de protéines dénaturées évitant ainsi leur agrégation. A partir de toutes ces données, il était donc concevable de supposer qu'une augmentation du taux de *O*-GlcNAc, concomitante à l'augmentation du taux de HSP70,

puisse intervenir dans le développement de l'atrophie ainsi que dans le métabolisme des protéines.

Les modifications des taux de *O*-GlcNAc, ainsi que la modification par *O*-GlcNAc de certains marqueurs d'atrophie musculaire, laissent penser que cette glycosylation puisse jouer un rôle au cours de l'atrophie musculaire induite par hypodynamie-hypokinésie, tout au moins dans l'homéostasie des protéines au cours de l'atrophie musculaire. La poursuite de ce travail consistera en l'identification d'autres marqueurs glycosylés impliqués dans la transition d'un muscle de phénotype lent en un muscle de phénotype rapide. En particulier, les protéines-*O*-GlcNAc du muscle squelettique seront purifiées par chromatographie d'affinité selon le protocole largement utilisé au cours de ces travaux, à la fois dans le muscle lent et dans le muscle rapide, et ce dans des conditions contrôles et après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. Les protéines exprimées différemment pourront alors être analysées et identifiées par approche protéomique. Il sera également intéressant de déterminer si le taux de glycosylation augmente ou au contraire diminue après atrophie sur chacun de ces marqueurs.

Une étude plus approfondie pourra également être réalisée sur certaines protéines d'intérêt, en particulier la MLC2. Nos travaux ont montré que la MLC2 est modifiée par la *O*-GlcNAc. Or, de récents travaux mettent en évidence une augmentation de la phosphorylation associée à la transition d'un muscle de phénotype lent en un muscle de phénotype rapide (Bozzo et coll., 2003). De par l'existence de la balance phosphorylation/*O*-GlcNAc, il sera d'intérêt de déterminer si une éventuelle diminution de la *O*-GlcNAc sera corrélée à cette augmentation de phosphorylation.

III – *O*-GlcNAc et contraction musculaire.

Enfin, la troisième partie de notre travail présente un très grand intérêt quant à une nouvelle approche de la compréhension du mécanisme de la contraction musculaire. En effet, l'identification de protéines contractiles modifiées par la *O*-GlcNAc et de protéines lectines vis-à-vis de ce monosaccharide nous laisse supposer que ce type de modification post-traductionnelle puisse intervenir dans les interactions protéine-protéine intervenant dans le mécanisme de contraction musculaire. La plupart des protéines contractiles, telles que les chaînes lourdes et légères de myosine, l'actine et la tropomyosine, sont *O*-N-acétylglucosaminylées. Ces protéines modifiées par la *O*-GlcNAc semblent également présenter des propriétés lectiniques vis-à-vis de ce monosaccharide.

Afin de mieux appréhender la fonctionnalité de la *O*-GlcNAc dans le mécanisme de contraction musculaire, il faudra en tout premier lieu identifier les sites de *O*-GlcNAc au niveau des protéines contractiles. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, la technique utilisée au cours de cette thèse n'est pas la mieux adaptée à cet objectif, puisque d'une part, elle est assez laborieuse, mais en plus, elle ne permet pas d'identifier le site exact de glycosylation, mais seulement le peptide porteur de la *O*-GlcNAc. C'est pourquoi nous nous proposons d'appliquer au sein du laboratoire la technique BEMAD (β -élimination suivie d'une addition de Michael avec le dithiothréitol) (Wells et coll., 2002). La β -élimination du motif *O*-GlcNAc des résidus de sérine et de thréonine suivie de l'attaque nucléophile du dithiothréitol sur le groupement carbonyle α,β -insaturé conduit à un marquage de l'acide aminé glycosylé, permettant ultérieurement une purification du peptide ainsi marqué sur colonne d'affinité (colonne de thiol-immobilisé sur billes de sépharose). De plus, cette nouvelle liaison est stable lors de la dissociation induite par la collision, et la masse particulière de l'acide aminé ainsi modifié permet une identification précise du site initialement modifié par la glycosylation.

Il sera également d'un grand intérêt de déterminer les différents partenaires protéiques dont l'interaction dépend de la *O*-GlcNAc, par exemple en réalisant des co-immunoprécipitations, en présence ou en l'absence de N-acétyl-D-glucosamine, ou alors par purification des protéines contractiles ayant une activité lectinique vis-à-vis du motif *O*-GlcNAc et recherche du ligand endogène.

Une fois les partenaires protéiques dépendant de la *O*-GlcNAc bien identifiés, la détermination du site lectinique, c'est-à-dire le motif peptidique reconnaissant le motif *O*-GlcNAc, devra être envisagée. Pour cela, différentes approches pourront être effectuées : d'une part l'étude conformationnelle des sites lectiniques pourra être réalisée par modélisation moléculaire *in silico*. D'autre part, il est possible de réaliser des digestions tryptiques ménagées par protection du site lectinique avec des billes de GlcNAc ; le peptide ainsi retenu sur les billes de GlcNAc-immobilisée sera séquencé par spectrométrie de masse en tandem afin de déterminer le motif minimal de fixation au résidu de GlcNAc. Il existe également d'autres techniques permettant de déterminer les régions d'interaction entre deux protéines. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un « cross-linker » chimique, c'est-à-dire un agent de liaison covalente permettant d'établir un pontage entre les deux protéines en interaction, cette liaison étant établie dans la région d'interaction (Bennett et coll., 2000).

Nos résultats suggèrent donc un rôle fondamental de la O-GlcNAc au sein du muscle squelettique. En effet, cette modification post-traductionnelle jouerait un rôle clé aussi bien au niveau métabolique que contractile. De plus, elle interviendrait également dans le développement (ou la prévention) de l'atrophie de non-utilisation. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ouvrent un grand nombre de voies possibles quant à l'étude des processus de la cellule musculaire (en particulier le métabolisme et la contraction musculaires), et la poursuite de ce travail devrait aboutir à long terme à une meilleure compréhension de la physiologie musculaire, et permettra d'appréhender de nouveaux moyens de régulation des différents processus musculaires...

Bibliographie

- A -

Adam SA, Marr RS, and Gerace L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell. Biol.* **111**, 807-816

Akimoto Y, Comer FI, Cole RN, Kudo A, Kawakami H, Hirano H, and Hart GW. (2003) Localization of the O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex. *Brain. Res.* **966**, 194-205

Albert T, Urlbauer B, Kohlhuber F, Hammersen B, and Eick D. (1994) Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene.* **9**, 759-763

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. (1993). Biologie moléculaire de la cellule. *Deuxième édition. Edition Médecine-Science Flammarion*, pp1219

Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, and Iqbal K. (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 298-303

Arias EB, Kim J, and 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

Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, and Hart GW. (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **271**, 28741-28744

Arrigo AP, and Welch WJ. (1987) Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 15359-15369

Atomi Y, Yamada S, and Nishida T. (1991) Early changes of alpha B-crystallin mRNA in rat skeletal muscle to mechanical tension and denervation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1323-1330

- B -

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

Barton PJ, and Buckingham ME. (1985) The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.* **231**, 249-261

Baskin RJ, and Deamer DW. (1970) A membrane-bound creatine phosphokinase in fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **245**, 1345-1347

Bastide B, Conti A, Sorrentino V, and Mounier Y. (2000) Properties of ryanodine receptors in rat muscles submitted to hindlimb suspension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 442-447

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

Behlke J, Lutsch G, Gaestel M, and Bielka H. (1991) Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp25. *FEBS. Lett.* **288**, 119-122

Benko DM, Haltiwanger RS, Hart GW, and Gibson W. (1988) Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contains O-linked N-acetylglucosamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 2573-2577

Bennett KL, Kussmann M, Bjork P, Godzwon M, Mikkelsen M, Sorensen P, and Roepstorff P. (2000) Chemical cross-linking with thiol-cleavable reagents combined with differential mass spectrometric peptide mapping--a novel approach to assess intermolecular protein contacts. *Protein. Sci.* **9**, 1503-1518

Blumenfeld ML, and Krisman CR. (1986) The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart alpha-1,4 glucans tightly associated with glycogen synthase. *Eur. J. Biochem.* **156**, 163-169

Blumenschein TM, Tripet BP, Hodges RS, and Sykes BD. (2001) Mapping the interacting regions between troponins T and C. Binding of TnT and TnI peptides to TnC and NMR mapping of the TnT-binding site on TnC. *J. Biol. Chem.* **276**, 36606-36612

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, and Glass DJ. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* **294**, 1704-1708

Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, and Mak TW. (2000) Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *EMBO. J.* **19**, 5092-5104

Bortolotto SK, Cellini M, Stephenson DG, and 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

Botti J, Musset M, Moutsita R, Aubery M, Derappe C. (2003) Two laminin receptors with N-acetylglucosamine-binding specificity. *Biochimie.* **85**, 231-239

Bibliographie

Bozzo C, Stevens L, Toniolo L, Mounier Y, and Reggiani C. (2003) Increased phosphorylation of myosin light chain associated with slow-to-fast transition in rat soleus. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**, C575-583

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

Breitbart RE, Nguyen HT, Medford RM, Destree AT, Mahdavi V, and Nadal-Ginard B. (1985) Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. *Cell.* **41**, 67-82

Brion JP, Anderton BH, Authelet M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, and Tremp G. (2001) Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochem. Soc. Symp.* **67**, 81-88

Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, and Hof PR. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* **33**, 95-130. Review

- C -

Caillet-Boudin ML, Strecker G, and Michalski JC. (1989) O-linked GlcNAc in serotype-2 adenovirus fibre. *Eur. J. Biochem.* **184**, 205-211

Caiozzo VJ, Baker MJ, and Baldwin KM. (1998) Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* **85**, 2237-2248

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

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Herrick RE, Prietto N, Baldwin KM. (1996) Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle." *J. Appl. Physiol.* **81** : 123-132.

Campione M, Ausoni S, Guezennec CY, Schiaffino S. (1993) Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* **74** : 1156-1160

Carter ND, Wistrand PJ, Isenberg H, Askmark H, Jeffery S, Hopkinson D, and Edwards Y. (1988) Induction of carbonic anhydrase III mRNA and protein by denervation of rat muscle. *Biochem. J.* **256**, 147-152

Cheng X, Cole RN, Zaia J, and Hart GW. (2000) Alternative O-glycosylation / O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry.* **39**, 11609-11620

Bibliographie

- Cheng X, and Hart GW.** (2000) Glycosylation of the murine estrogen receptor-alpha. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **75**, 147-158
- 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, and Malik NA.** (1987) Interactions of troponin subunits: free energy of binary and ternary complexes. *Biochemistry.* **26**, 5904-5907
- Chou TY, Dang CV, and Hart, GW.** (1995a) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4417-4421
- Chou TY, Hart GW, and Dang CV.** (1995b) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* **270**, 18961-18965
- Chou CF, and Omary MB.** (1993) Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J. Biol. Chem.* **268**, 4465-4472
- Chou CF, Smith AJ, and Omary MB.** (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cyokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* **267**, 3901-3906
- Ciechanover A, and Schwartz AL.** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 2727-2730
- 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
- Clarke FM, and Masters CJ.** (1975) On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **381**, 37-46
- 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
- Cole RN, and Hart GW.** (2001) Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J. Neurochem.* **79**, 1080-1089
- 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.** (2000) O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J. Biol. Chem.* **275**, 29179-29182
- 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

Bibliographie

Conti A, Gorza L, and Sorrentino V. (1996) Differential Distribution of Ryanodine Receptor 3 Gene Product in Mammalian Skeletal Muscle. *Biochem. J.* **316** : 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

Cowles EA, Moutsatsos IK, Wang JL, and Anderson RL. (1989) Expression of carbohydrate binding protein 35 in human fibroblasts: comparisons between cells with different proliferative capacities. *Exp. Gerontol.* **24**, 577-585

Crete P, and Landry J. (1990) Induction of HSP27 phosphorylation and thermoresistance in Chinese hamster cells by arsenite, cycloheximide, A23187, and EGTA. *Radiat. Res.* **121**, 320-327

Cros N, Muller J, Bouju S, Pietu G, Jacquet C, Leger JJ, Marini JF, and Dechesne CA. (1999) Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase : two markers of muscle disuse. *Am. J. Physiol.* **276**, R308-316

Cummins P, and Perry SV. (1973) The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.* **133**, 765-777

Cushman SW, and Wardzala LJ. (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **255**, 4758-4762

- D -

Dantzig JA, Goldman YE, Millar NC, Lacktis J, and Homsher E. (1992) Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J. Physiol.* **451**, 247-278

Das AK, Cohen PW, and Barford D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO. J.* **17**, 1192-1199

Datta B, Ray MK, Chakrabarti D, Wylie DE, and Gupta NK. (1989) Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiation factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 alpha-subunit. *J. Biol. Chem.* **264**, 20620-20624

Davis LI, and Blobel G. (1987) Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 7552-7556

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.* **80**, 261-270

Desplanches D. (1997) Structural and Functional Adaptations of Skeletal Muscle to Weightlessness. *Int. J. Sports. Med.* **18**, S259-S264. Review

Desplanches D, Mayet MH, Ilyina-Kakueva EI, Frutoso J, and 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

Desplanches D, Mayet MH, Sempore B, and Flandrois R. (1987) Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J. Appl. Physiol* **63**, 558-563

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

Dieckmann-Schuppert A, Bause E, and Schwarz RT. (1993) Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *Eur. J. Biochem.* **216**, 779-788

Diffie GM, Caiozzo VJ, Herrick RE, and Baldwin KM. (1991) Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am. J. Physiol.* **260**, C528-C534,

Ding M, and Vandre DD. (1996) High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **271**, 12555-12561

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

Dong DL, Xu ZS, Chevrier MR, Cotter RJ, Cleveland DW, and Hart GW. (1993) Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J. Biol. Chem.* **268**, 16679-16687

Dong DL, Xu ZS, Hart GW, and Cleveland DW. (1996) Cytoplasmic O-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J. Biol. Chem.* **271**, 20845-20852

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, and Brownlee M. (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J. Clin. Invest.* **108**, 1341-1348

Duverger E, Carpentier V, Roche AC, and Monsigny M. (1993) Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp. Cell. Res.* **207**, 197-201

Dzeja PP, and Terzic A. (1998) Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *FASEB. J.* **12**, 523-529. Review

- E -

Eastwood AB, Wood DS, Bock KL and Sorenson MM. (1979) Chemically skinned mammalian skeletal muscle. I. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue. Cell.* **11**, 553-566

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

Edgerton VR, and Roy RR. (1996) The Gravitational Environment : "Neuromuscular adaptation to actual and simulated spaceflight. *Handbook of Physiology, section 4, Environmental Physiology.* New York, Oxford UP : Fregly M.J. and C.M. Blatteis, vol. III, p.721-763

Eizirik DL, Sandler S, Ahnstrom G, and Welsh M. (1991) Exposure of pancreatic islets to different alkylating agents decreases mitochondrial DNA content but only streptozotocin induces long-lasting functional impairment of B-cells. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 2275-2282

English AW, Eason J, Pol M, Schwartz G, and Shirley A. (1998) Different phenotypes among slow/beta myosin heavy chain-containing fibres of rabbit masseter muscle : a novel type of diversity in adult muscle. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **19**, 525-535

- F -

Fabiato A. (1988) Computer programs for calculating total free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods. Enzymol.* **157**, 378-417

Fahrenkrog B, and Aebi U. (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 757-766. Review

Fang B, and Miller MW. (2001) Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-linked N-acetyl-d-glucosamine: a potential role for O-GlcNAc during cell division. *Exp. Cell. Res.* **263**, 243-253

Farah CS, Miyamoto CA, Ramos CH, Da Silva AC, Quaggio RB, Fujimori K, Smillie LB, and 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

Farras R, Bossis G, Andermarcher E, Jariel-Encontre I, and Piechaczyk M. (2005) Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **54**, 31-51. Review

Favreau C, Worman HJ, Wozniak RW, Frappier T, and Courvalin JC. (1996) Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210.

Bibliographie

Biochemistry. **35**, 8035-8044

Fedarko NS, and Conrad HE. (1986) A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells. *J. Cell. Biol.* **102**, 587-599

Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, and Lauro R. (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation*. **106**, 466-472

Felin M, Doyennette-Moyne MA, Hadj-Sahraoui Y, Aubery M, Hubert J, and Seve AP. (1994) Identification of two nuclear N-acetylglucosamine-binding proteins. *J. Cell. Biochem.* **56**, 527-535

Finlay DR, Newmeyer DD, Price TM, and Forbes DJ. (1987) Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell. Biol.* **104**, 189-200

Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, and Kajstura J. (2001) Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes*. **50**, 2363-2375

Fitts RH, Brimmer CJ, Heywood-Cooksey A, and Timmerman RJ. (1989) Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *Am. J. Physiol* **256**, C1082-C1091

Fitts RH, Riley DR, and Widrick JJ. (2000) Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* **89**, 823-839

Flicker PF, Phillips GN Jr, and Cohen C. (1982) Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J. Mol. Biol.* **162**, 495-501

Foucault G, Vacher M, Cribier S, and Arrio-Dupont M. (2000) Interactions between beta-enolase and creatine kinase in the cytosol of skeletal muscle cells. *Biochem. J.* **346**, 127-131

- 9 -

Gahlmann R, Troutt AB, Wade RP, Gunning P, and Kedes L. (1987) Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T. *J. Biol. Chem.* **262**, 16122-16126

Gao Y, Miyazaki J, and 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, and 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

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

Gerlach G, and Hofer HW. (1986) Interaction of immobilized phosphofructokinase with soluble muscle proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **881**, 398-404

Gewinner C, Hart GW, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C, and Groner B. (2003) The coactivator of transcription CREB binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J. Biol. Chem.* **279**, 3563-3572

Gill SR, Wong PC, Monteiro MJ, and Cleveland DW. (1990) Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. *J. Cell. Biol.* **111**, 2005-2019

Glickman MH, and Ciechanover A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373-428. *Review*

Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P, and 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

Gonzalez SA, and Burrone OR. (1991) Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology.* **182**, 8-16

Gordon AM, Homsher E, and Regnier M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**, 853-924

Gorlich D, and Kutay U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**, 607-660. *Review*

Grabarek Z, Grabarek J, Leavis PC, and Gergely J. (1983) Cooperative binding to the Ca²⁺-specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J. Biol. Chem.* **258**, 14098-14102

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

Greis KD, Gibson W, and Hart GW. (1994) Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J. Virol.* **68**, 8339-8349

Grichko VP, Heywood-Cooksey A, Kidd KR, and Fitts RH. (2000) Substrate profile in rat soleus muscle fibers after hindlimb unloading and fatigue. *J. Appl. Physiol.* **88**, 473-478

Griffith LS, Mathes M, and Schmitz B. (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified

with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurosci. Res.* **41**, 270-278

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

Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, and 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

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, and Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994-999

- H -

Hagmann J, Grob M, and Burger MM. (1992) The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *J. Biol. Chem.* **267**, 14424-14428

Haltiwanger RS, Blomberg MA, and 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, and 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

Haltiwanger RS, Holt GD, and Hart GW. (1990) Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine : peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **265**, 2563-2568

Haltiwanger RS, and Philipsberg GA. (1997) Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked N-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-glycans on proteins from HT29 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 8752-8758

Hammell RL, and Hitchcock-DeGregori SE. (1996) Mapping the functional domains within the carboxyl terminus of alpha-tropomyosin encoded by the alternatively spliced ninth exon. *J. Biol. Chem.* **271**, 4236-4242

Han I, and Kudlow JE. (1997) Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2550-2558

Hanover JA. (2001) Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB. J.* **15**, 1865-1876. Review

Hanover JA, Cohen CK, Willingham MC, and 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

Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, and Love DC. (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 287-297

Hardie DG. (2004) AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **36**, 28-34. *Review*

Hart GW, Greis KD, Dong LY, Blomberg MA, Chou TY, Jiang MS, Roquemore EP, Snow DM, Kreppel LK, Cole RN, et al. (1995) O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **376**, 115-123. *Review*

Hartner KT, Kirschbaum BJ, and Pette D. (1989) The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.* **179**, 31-38

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

Hatsell S, Medina L, Merola J, Haltiwanger R, and Cowin P. (2003) Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *J. Biol. Chem.* **278**, 37745-37752

Hawkins M, Angelov I, Liu R, Barzilai N, and Rossetti L. (1997) The tissue concentration of UDP-N-acetylglucosamine modulates the stimulatory effect of insulin on skeletal muscle glucose uptake. *J. Biol. Chem.* **272**, 4889-4895

Hebert LF Jr, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL, Simmons ST, Neidigh JL, Zhu JS, Baron AD, and McClain DA. (1996) Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **98**, 930-936

Heeley DH, Golosinska K, and Smillie LB. (1987) The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* **262**, 9971-9978

Hershko A, and Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479. *Review*

Hiller AM, Koro LA, and Marchase RB. (1987) Glucose-1-phosphotransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase have distinct acceptor specificities. *J. Biol. Chem.* **262**, 4377-4381

Hinkle A, Goranson A, Butters CA, and Tobacman LS. (1999) Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation. A deletional study of cardiac troponin T. *J. Biol. Chem.* **274**, 7157-7164

Bibliographie

Hikomura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, and Usheva A. (2003) YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation). *J. Biol. Chem.* **278**, 14046-14052

Hirschberg CB, and Snider MD. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 63-87. Review

Hitchcock-DeGregori SE, Song Y, and Greenfield NJ. (2002) Functions of tropomyosin's periodic repeats. *Biochemistry.* **41**, 15036-15044

Holmes KC. (1996) Muscle proteins--their actions and interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 781-789

Holmes KC, Popp D, Gebhard W, and Kabsch W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49

Holt GD, Haltiwanger RS, Torres CR, and Hart GW. (1987) Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *J. Biol. Chem.* **262**, 14847-14850

Holt GD, and Hart GW. (1986) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **261**(17), 8049-8057

Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, and Hart GW. (1987) Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell. Biol.* **104**, 1157-1164

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

Huber B, and Pette D. (1996) Dynamics of parvalbumin expression in low-frequency-stimulated fast-twitch rat muscle. *Eur. J. Biochem.* **236**, 814-816

Huxley HE. (1975) Proceedings: Structural basis of contraction in muscle. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **356**, 377

- | -

Inaba M, and Maede Y. (1989) O-N-acetyl-D-glucosamine moiety on discrete peptide of multiple protein 4.1 isoforms regulated by alternative pathways. *J. Biol. Chem.* **264**, 18149-18155

Ishihara M, Fedarko NS, Conrad HE. (1986) Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **261**, 13575-13580

Iyer SP, Akimoto Y, and Hart GW. (2003) Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with O-GlcNAc transferase. *J. Biol. Chem.* **278**,

5399-5409

Iyer SP, and Hart GW. (2003a) Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **278**, 24608-24616

Iyer SP, and Hart GW. (2003b) Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc cycling. *Biochemistry.* **42**, 2493-2499

- J -

Jackson SP, and Tjian R. (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* **55**, 125-133

James LR, Tang D, Ingram A, Ly H, Thai K, Cai L, and Scholey JW. (2002) Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation. *Diabetes.* **51**, 1146-1156

Janssen E, Terzic A, Wieringa B, and Dzeja PP. (2003) Impaired intracellular energetic communication in muscles from creatine kinase and adenylate kinase (M-CK/AK1) double knock-out mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 30441-30449

Jiang MS, and Hart GW. (1997) A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **272**, 2421-2428

Jiang B, Ohira Y, Roy RR, Nguyen Q, Ilyina-Kakueva EI, Oganov V, and Edgerton VR. (1992) Adaptation of fibers in fast-twitch muscles of rats to spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* **73**, 58S-65S

Jockers-Wretou E, Giebel W, and Pfleiderer G. (1977) Immunohistochemical localization of creatin kinase isoenzymes in human tissue. *Histochemistry.* **54**, 83-95

- K -

Kamemura K, and Hart GW. (2003) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **73**, 107-136. *Review*

Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, and Weir GC. (2001) Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **276**, 31099-31104

Kato GJ, and Dang CV. (1992) Function of the c-Myc oncoprotein. *FASEB. J.* **6**, 3065-3072. *Review*

- Kawai M, Guth K, Winnikes K, Haist C, and 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
- Kearse KP, and Hart GW.** (1991a) Topology of O-linked N-acetylglucosamine in murine lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 543-548
- Kearse KP, and Hart GW.** (1991b) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 1701-1705
- Kelly WG, Dahmus ME, and 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
- King IA, and Hounsell EF.** (1989) Cytokeratin 13 contains O-glycosidically linked N-acetylglucosamine residues. *J. Biol. Chem.* **264**, 14022-14028
- 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*, p194
- Kischel P, Bastide B, Muller M, Dubail F, Offredi F, Jin JP, Mounier Y, and 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
- Kischel P, Bastide B, Stevens L, and Mounier Y.** (2001) Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading. *J. Appl. Physiol.* **90**, 1095-1101
- Konrad RJ, and Kudlow JE.** (2002) The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int. J. Mol. Med.* **10**, 535-539. *Review*
- Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, and Kudlow JE.** (2001) The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem. J.* **356**, 31-41
- Konrad RJ, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, and Kudlow JE.** (2002) Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 207-212
- Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, Miyake K, Sano W, Akimoto K, Ohno S, and Kasuga M.** (1998) Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6971-6982
- Kreppel LK, Blomberg MA, and 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

Bibliographie

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

Kroncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, and Kolb-Bachofen V. (1995) Nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **376**, 179-185

- L -

Labeit S, and Kolmerer B. (1995) Titins : giant proteins in charge of muscle ultra-structure and elasticity. *Science.* **270**, 293-296

Lamarre-Vincent N, and Hsieh-Wilson LC. (2003) Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6612-6613

Lamb JR, Tugendreich S, and Hieter P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends. Biochem. Sci.* **20**, 257-259. *Review*

Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, and Anderson CW. (1992) Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J. Biol. Chem.* **267**, 794-803

Lawler JM, Song W, and Demaree SR. (2003) Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free. Radic. Biol. Med.* **35** : 9-16

Lawrence JC Jr, and Roach PJ. (1997) New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes.* **46**, 541-547. *Review*

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

Lees-Miller JP, and Helfman DM. (1991) The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *Bioessays* **13**, 429-437

Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, Caillet-Boudin ML, and Michalski JC. (1999) Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* **1472**, 71-78

Lefebvre T, Baert F, Bodart JF, Flament S, Michalski JC, and Vilain JP. (2004a) Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J. Cell. Biochem.* **93**, 999-1010

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

Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML. (2003) Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1619**, 167-176

Lefebvre T, Pinte S, Guerardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny MC, Michalski JC, and Leprince D. (2004b) The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3843-3854

Lefebvre T, Planque N, Leleu D, Bailly M, Caillet-Boudin ML, Saule S, and Michalski JC. (2002) O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *J. Cell. Biochem.* **85**, 208-218

Lescuyer P, Chevallet M, and Rabilloud T. (2004) L'analyse protéomique : concepts, réalités et perspectives en thérapeutique. *Médecine sciences.* **20**, 587-592

Leterme D, Cordonnier C, Mounier Y, and Falempin M. (1994) Influence of chronic stretching upon rat soleus muscle during non-weight-bearing conditions. *Pflugers. Arch.* **429**, 274-279

Levine BA, Moir AJ, and Perry SV. (1988) The interaction of troponin-I with the N-terminal region of actin. *Eur. J. Biochem.* **172**, 389-397

Levitsky DO, Levchenko TS, Saks VA, Sharov VG, and Smirnov VN. (1978) The role of creatine phosphokinase in supplying energy for the calcium pump system of heart sarcoplasmic reticulum. *Membr. Biochem.* **2**, 81-96

Li Y, Mui S, Brown JH, Strand J, Reshetnikova L, Tobacman LS, and Cohen C. (2002) The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7378-7383

Lichtsteiner S, and Schibler U. (1989) A glycosylated liver-specific transcription factor stimulates transcription of the albumin gene. *Cell.* **57**, 1179-1187

Liu K, Paterson AJ, Chin E, and 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. USA.* **97**, 2820-2825

Liu K, Paterson AJ, Zhang F, McAndrew J, Fukuchi K, Wyss JM, Peng L, Hu Y, and Kudlow JE. (2004) Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. *J. Neurochem.* **89**, 1044-1055

Locke M, Noble EG, and Atkinson BG. (1991) Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern. *Am. J. Physiol.* **261** : C774-C779

Love DC, Kochan J, Cathey RL, Shin SH, and Hanover JA. (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J. Cell. Sci.* **116**, 647-654

Bibliographie

Lowey S, Slayter HS, Weeds AG, and Baker H. (1969) Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* **42**, 1-29

Lubas WA, Frank DW, Krause M, and Hanover JA. (1997) O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* **272**, 9316-9324

Lubas WA, and Hanover JA. (2000) Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **275**, 10983-10988

Luthi T, Haltiwanger RS, Greengard P, and Bahler M. (1991) Synapsins contain O-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurochem.* **56**, 1493-1498

- M -

Ma YZ, and Taylor EW. (1994) Kinetic mechanism of myofibril ATPase. *Biophys. J.* **66**, 1542-1553

MacClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, and Hanover JA. (2002) Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 10695-10699

MacClellan AJ, and Frydman J. (2001) Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat. Cell. Biol.* **3**, E51-E53

MacDaniel ML, Marshall CA, Pappan KL, and Kwon G. (2002) Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic beta-cells. *Diabetes.* **51**, 2877-2885. *Review*

MacDonald KS, Blaser CA, and Fitts RH. (1994) Force-velocity and power characteristics of rat soleus muscle fibers after hindlimb Suspension. *J. Appl. Physiol.* **77**, 1609-1616

MacDonald KS, and Fitts RH. (1995) Effects of hindlimb unloading on rat soleus fiber force, stiffness, and calcium sensitivity. *J. Appl. Physiol.* **79**, 1796-1802

MacLennan DH, Rice WJ, and Green NM. (1997) The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *J. Biol. Chem.* **272** : 28815-28818

Mak AS, and Smillie LB. (1981) Structural interpretation of the two-site binding of troponin on the muscle thin filament. *J. Mol. Biol.* **149**, 541-550

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, and Lowry OH. (1990) Effect of microgravity on metabolic enzymes of individual muscle fibers. *FASEB J.* **4**, 55-63

Bibliographie

- Margolis RK, Crockett CP, Kiang WL, Margolis RU.** (1976) Glycosaminoglycans and glycoproteins associated with rat brain nuclei. *Biochim. Biophys. Acta.* **451**, 465-469
- Margolis RK, Thomas MD, Crockett CP, Margolis RU.** (1979) Presence of chondroitin sulfate in the neuronal cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1711-1715
- Marshall S, Bacote V, and 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
- Matsuoka Y, Matsuoka Y, Shibata S, Yasuhara N, and Yoneda Y.** (2002) Identification of Ewing's sarcoma gene product as a glycoprotein using a monoclonal antibody that recognizes an immunodeterminant containing O-linked N-acetylglucosamine moiety. *Hybrid. Hybridomics.* **21**, 233-236
- Maytum R, Lehrer SS, and Geeves MA.** (1999) Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* **38**, 1102-1110
- Medina M, Grove K, and Haltiwanger RS.** (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology* **8**, 383-391
- Meikrantz W, Smith DM, Sladicka MM, and Schlegel RA.** (1991) Nuclear localization of an O-glycosylated protein phosphotyrosine phosphatase from human cells. *J. Cell. Sci.* **98**, 303-307
- Mejean C, Pons F, Benyamin Y, and Roustan C.** (1989) Antigenic probes locate binding sites for the glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and phosphofructokinase on the actin monomer in microfilaments. *Biochem. J.* **264**, 671-677
- Merkulova T, Lucas M, Jabet C, Lamande N, Rouzeau JD, Gros F, Lazar M, and Keller A.** (1997) Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase : developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins. *Biochem. J.* **323**, 791-800
- Metzger JM, Greaser ML, and 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
- 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
- Miller MW, Caracciolo MR, Berlin WK, and Hanover JA.** (1999) Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 51-60
- Miller MW, and Hanover JA.** (1994) Functional nuclear pores reconstituted with beta 1-4 galactose-modified O-linked N-acetylglucosamine glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 9289-9297
- Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K, and Yahara I.** (1991) Analysis of native

Bibliographie

forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J. Biol. Chem.* **266**, 10099-10103

Mizusawa H, Takagi A, Sugita H, and Toyokura Y. (1982) Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. *J. Biochem.(Tokyo)* **91**, 423-425

Moore LA, Arrizubieta MJ, Tidyman WE, Herman LA, and Bandman E. (1992) Analysis of the chicken fast myosin heavy chain family. Localization of isoform-specific antibody epitopes and regions of divergence. *J. Mol. Biol.* **225**, 1143-1151

Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, and Baylink DJ. (1979) A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist.* **22**, S23-S24

Morris EP, and Lehrer SS. (1984) Troponin-tropomyosin interactions. Fluorescence studies of the binding of troponin, troponin T, and chymotryptic troponin T fragments to specifically labeled tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 2214-2220

Mullis KG, Haltiwanger RS, Hart GW, Marchase RB, and Engler JA. (1990) Relative accessibility of N-acetylglucosamine in trimers of the adenovirus types 2 and 5 fiber proteins. *J. Virol.* **64**, 5317-5323

Murakami N, Kumon A, Matsumura S, Hara S, and Ikenaka T. (1988) Phosphorylation of the heavy chain of skeletal muscle myosin by casein kinase II : localization of the phosphorylation site to the amino terminus. *J. Biochem.* **103**, 209-211

Murphy JE, Hanover JA, Froehlich M, DuBois G, and Keen JH. (1994) Clathrin assembly protein AP-3 is phosphorylated and glycosylated on the 50-kDa structural domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 21346-21352

Musacchia XJ, and Deavers DR. (1980) A new rat model for studies of hypokinesia and antiorthostasis. *Physiologist.* **23**, S91-S92

Musacchia XJ, Steffen JM, Fell RD, Dombrowski MJ, Oganov VW, and Ilyina-Kakueva EI. (1992) Skeletal muscle atrophy in response to 14 days of weightlessness: vastus medialis. *J. Appl. Physiol* **73**, 44S-50S

Muthuchamy M, Rethinasamy P, and Wieczorek DF. (1997) Tropomyosin structure and function. New insights. *Trends Cardiovasc. Med.* **7**, 124-128

- N -

Nabeshima Y, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M, and Ogata K. (1984) Alternative transcription and two modes of splicing results in two myosin light chains from one gene. *Nature.* **308**, 333-338

Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, and Aoki J. (2000) Heat stress

attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J. Appl. Physiol.* **88**, 359-63

Nakamura M, Barber AJ, Antonetti DA, LaNoue KF, Robinson KA, Buse MG, and Gardner TW. (2001) Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons. *J. Biol. Chem.* **276**, 43748-43755

Nozais M, Merkulova T, Keller A, Janmot C, Lompre AM, D'Albis A, and Lucas M. (1999) Denervation of rabbit gastrocnemius and soleus muscles : effect on muscle-specific enolase. *Eur. J. Biochem.* **263**, 195-201

- O -

Oganov VS, Skuratova SA, Potapov AN, and Shirvinskaya MA. (1980) Physiological mechanisms of adaptation of rat skeletal muscles to weightlessness and similar functional requirements. *Physiologist* **23**, S16-S21

Ohira Y, Jiang B, Roy RR, Oganov V, Ilyina-Kakueva E, Marini JF, and Edgerton VR. (1992) Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol* **73**, 51S-57S

Oishi Y. (1993) Relationship between myosin heavy chain IId isoform and fibre types in soleus muscle of the rat after hindlimb suspension. *Eur. J. Appl. Physiol Occup. Physiol* **66**, 451-454

Oishi Y, Ishihara A, Yamamoto H, and Miyamoto E. (1998) Hindlimb suspension induces the expression of multiple myosin heavy chain isoforms in single fibres of the rat soleus muscle. *Acta. Physiol. Scand.* **162**, 127-134

Olmsted JB. (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **2**, 421-457

Ookata K, Hisanaga S, Bulinski JC, Murofushi H, Aizawa H, Itoh TJ, Hotani H, Okumura E, Tachibana K, and Kishimoto T. (1995) Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J. Cell. Biol.* **128**, 849-862

- P -

Park SY, Ryu J, and 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 GJ, Lund KC, Taylor RP, and McClain DA. (2003) Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **278**, 10022-10027

Bibliographie

- Parker G, Taylor R, Jones D, and McClain D.** (2004) Hyperglycemia and inhibition of glycogen synthase in streptozotocin-treated mice: role of O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **279**, 20636-20642
- Pate E, and Cooke R.** (1989) Addition of phosphate to active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke. *Pflugers Arch.* **414**, 73-81
- Pato MD, Mak AS, and Smillie LB.** (1981) Fragments of rabbit striated muscle alpha-tropomyosin. II. Binding to troponin-T. *J. Biol. Chem.* **256**, 602-607
- Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ, Kahn CR, and Yki-Jarvinen H.** (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* **48**, 1562-1571
- Parmacek MS, and Leiden JM.** (1991) Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation* **84**, 991-1003
- Pawson T, and Scott JD.** (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* **278**, 2075-2080. *Review*
- Pearlstone JR, and Smillie LB.** (1982) Binding of troponin-T fragments to several types of tropomyosin. Sensitivity to Ca²⁺ in the presence of troponin-C. *J. Biol. Chem.* **257**, 10587-10592
- Periasamy M, Strehler EE, Garfinkel LI, Gubits RM, Ruiz-Opazo N, and Nadal-Ginard B.** (1984) Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *J. Biol. Chem.* **259**, 13595-13604
- Perrie WT, Smillie LB, and Perry SB.** (1973) A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle. *Biochem. J.* **135**, 151-164
- Perry SV.** (1998) Troponin T: genetics, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 575-602
- Perry SV.** (1999) Troponin I : inhibitor or facilitator. *Mol. Cell. Biochem.* **190**, 9-32
- Perry SV, Cole HA, Head JF, and Wilson FJ.** (1972) Localization and mode of action of the inhibitory component of the troponin complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 251-262
- Persechini A, Stull JT, and Cooke R.** (1985) The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* **260**, 7951-4795
- Pette D.** (2001) Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **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

Bibliographie

Phillips GN Jr, Fillers JP, and Cohen C. (1986) Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* **192**, 111-131

Pieples K, and Wieczorek DF. (2000) Tropomyosin 3 increases striated muscle isoform diversity. *Biochemistry* **39**, 8291-8297

Pinol-Roma S, and Dreyfuss G. (1993) hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends. Cell. Biol.* **3**, 151-155

Pol-Rodriguez MM, Schwartz GA, and English AW. (2001) Post-translational phosphorylation of the slow/beta myosin heavy chain isoform in adult rabbit masseter muscle. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **22**, 513-519

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, and DeRuisseau KC. (2005) Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R337-R344. *Review*

Previato JO, Sola-Penna M, Agrellos OA, Jones C, Oeltmann T, Travassos LR, and Mendonca-Previato L. (1998) Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*. Characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1-->O-threonine. *J. Biol. Chem.* **273**, 14982-14988

Price SR. (2003) Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **35**, 617-628. *Review*

Pulverer BJ, Fisher C, Vousden K, Littlewood T, Evan G, and Woodgett JR. (1994) Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene.* **9**, 59-70

- Q -

- R -

Ravindranath RM, Moradian-Oldak J, and Fincham AG. (1999) Tyrosyl motif in amelogenins binds N-acetyl-D-glucosamine. *J. Biol. Chem.* **274**, 2464-2471

Rawn JD. (1989) « Le cycle du citrate » *Traité de Biochimie*, Edition Universitaire pp 329-358

Bibliographie

- Rawn JD.** (1989) « La glycolyse » *Traité de Biochimie*, Edition Universitaire pp 289-327
- Rawn JD.** (1989) « La phosphorylation oxydative » *Traité de Biochimie*, Edition Universitaire pp 359-383
- 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 and Milligan RA.** (1993a) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science.* **261**, 58-65
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, and Holden HM.** (1993b) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science.* **261**, 50-58
- Reason AJ, Morris HR, Panico M, Marais R, Treisman RH, Haltiwanger RS, Hart GW, Kelly WG, and Dell A.** (1992) Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. *J. Biol. Chem.* **267**, 16911-16921
- Rechsteiner M, and Rogers SW.** (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends. Biochem. Sci.* **21**, 267-271. *Review*
- Reiser PJ, Greaser ML, and Moss RL.** (1992) Developmental changes in troponin T isoform expression and tension production in chicken single skeletal muscle fibres. *J. Physiol (Lond)* **449**, 573-588
- Reuben JP, Wood DS, and Eastwood AN.** (1977) Adaptation of single fiber techniques for the study of human muscle. In *pathogenesis of human muscular dystrophies*, Ed. Rowland L.P., Excerpta Medica Amsterdam, pp256-269
- Ritz-Gold CJ, Cooke R, Blumenthal DK and Stull JT.** (1980) Light chain phosphorylation alters the conformation of skeletal muscle myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**, 209-214
- Robert B, Daubas P, Akimenko MA, Cohen A, Garner I, Guenet JL, and Buckingham M.** (1984) A single locus in the mouse encodes both myosin light chains 1 and 3, a second locus corresponds to a related pseudogene. *Cell.* **39**, 129-140
- Rodriguez IR, and Whelan WJ.** (1985) A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 829-836
- Rogers S, Wells R, and Rechsteiner M.** (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* **234**, 364-368
- Roos MD, Su K, Baker JR, and Kudlow JE.** (1997) O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6472-6480
- Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, and Hart GW.** (1996) Dynamic O-

GlcNAcylation of the small heat shock protein α B-crystallin. *Biochemistry* **35**, 3578-3586

Roquemore EP, Dell A, Morris HR, Panico M, Reason AJ, Savoy LA, Wistow GJ, Zigler JS Jr, Earles BJ, and Hart GW. (1992) Vertebrate lens alpha-crystallins are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **267**, 555-563

Roth J. (1987) Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **906**, 405-436. Review

Roy RR, Baldwin KM, and Edgerton VR. (1991) The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* **19**, 269-312

- S -

Sano K, Maeda K, Oda T, and Maeda Y. (2000) The effect of single residue substitutions of serine-283 on the strength of head-to-tail interaction and actin binding properties of rabbit skeletal muscle alpha-tropomyosin. *J. Biochem.(Tokyo)* **127**, 1095-1102

Savabi, F. (1994) Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **133-134**, 145-152. Review

Schachat FH, Diamond MS, and Brandt PW. (1987) Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J. Mol. Biol.* **198**, 551-554

Schaertl S, Lehrer SS, and Geeves MA. (1995) Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation. *Biochemistry* **34**, 15890-15894

Schiaffino S, and Reggiani C. (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins : gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* **76**, 371-423

Schirm M, Arora SK, Verma A, Vinogradov E, Thibault P, Ramphal R, and Logan SM. (2004) Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**, 2523-2531

Schroder HC, Facy P, Monsigny M, Pfeifer K, Bek A, and Muller WE. (1992) Purification of a glucose-binding protein from rat liver nuclei. Evidence for a role in targeting of nuclear mRNP to nuclear pore complex. *Eur. J. Biochem.* **205**, 1017-1025

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

Seve AP, Felin M, Doyennette-Moyne MA, Sahraoui T, Aubery M, and Hubert J. (1993) Evidence for a lactose-mediated association between two nuclear carbohydrate-binding proteins. *Glycobiology.* **3**, 23-30

Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, and Marth JD.

Bibliographie

(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. USA* **97**, 5735-5739

Sharov VG, Saks VA, Smirnov VN, Chazov EI. (1977) An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **468**, 495-501

Shaw P, Freeman J, Bovey R, and Iggo R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene.* **12**, 921-930

Shulman RG, Bloch G, and Rothman DL. (1995) In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 8535-8542. Review

Shur BD, and Roth S. (1975) Cell surface glycosyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta.* **415**, 473-512

Slawson C, Pidala J, Potter R. (2001) Increased N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1537**, 147-157

Slawson C, Shafii S, Amburgey J, and Potter R. (2002) Characterization of the O-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1573**, 121-129

Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, and Hart GW. (2005) Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 32944-32956

Soltys BJ, and Gupta RS. (1992) Interrelationships of endoplasmic reticulum, mitochondria, intermediate filaments, and microtubules--a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem. Cell. Biol.* **70**, 1174-1186

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, and Farese RV. (1997) Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 30075-30082

Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Reed DW, Murray JD, Campos GE, and Gordon SE. (1998) Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem. Cell. Biol.* **110**, 73-80

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

Steinmetz EJ. (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: the tail that wags the dog? *Cell.* **89**, 491-494. Review

Stevens L, Bastide B, Bozzo C, and Mounier Y. (2004) Hybrid fibres under slow-to-fast

Bibliographie

transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers. Arch.* **448**, 507-514

Stevens L, Bastide B, Kischel P, Pette D, and Mounier Y. (2002) Time-dependent changes in the expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.* **282**, C1025-C1030

Stevens L, Mounier Y, and Holy X. (1993) Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am. J. Physiol* **264**, R770-R776

Stevens L, Mounier Y, Holy X, and Falempin M. (1990) Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* **68**: 334-340

Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, and 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

Sukegawa J, and Blobel G. (1993) A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell.* **72**, 29-38

Sutoh K. (1982) Identification of myosin-binding sites on the actin sequence. *Biochemistry.* **21**, 3654-3661

Suzuki K, and Kono T. (1980) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 2542-2545

Swain SM, Tseng TS, and Olszewski NE. (2001) Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant. Physiol.* **126**, 1174-1185

Sweeney HL, Bowman BF, and Stull JT. (1993) Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am. J. Physiol* **264**, C1085-C1095

Syska H, Wilkinson JM, Grand RJ, and 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, Zhao J, Jones M, Zhi G, Stull J, and 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, and Potter JD. (1996) The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **271**, 5246-5250

- T -

Talbot JA, and Hodges RS. (1981) Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit

Bibliographie

skeletal troponin I. Relationship of amino acid sequence to biological activity. *J. Biol. Chem.* **256**, 2798-2802

Takahashi H, Wada M, and Katsuta S. (1991) Expressions of myosin heavy chain IId isoform in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta. Physiol. Scand.* **143**, 131-132

Takeda S, Kobayashi T, Taniguchi H, Hayashi H, and Maeda Y. (1997) Structural and functional domains of the troponin complex revealed by limited digestion. *Eur. J. Biochem.* **246**, 611-617

Tanabe T, Yamada M, Noma T, Kajii T, and Nakazawa A. (1993) Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J. Biochem. (Tokyo)* **113**, 200-207

Tang J, Neidigh JL, Cooksey RC, and McClain DA. (2000) Transgenic mice with increased hexosamine flux specifically targeted to beta-cells exhibit hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance. *Diabetes.* **49**, 1492-1499

Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffe PJ, Van Obberghen E, and Le Marchand-Brustel Y. (1997) Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology.* **138**, 2005-2010

Tawa NE Jr, Odessey R, and Goldberg AL. (1997) Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J. Clin. Invest.* **100**, 197-203

Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M, and Dudenhoefter GA. (1988) Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol* **65**, 1191-1195

Thomason DB, Biggs RB, and 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* **68**, 1-12

Thomason DB, Herrick RE, Surdyka D, and Baldwin KM. (1987) Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol* **63**, 130-137

Thomson MJ, Williams MG, and Frost SC. (1997) Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 7759-7764

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

Toursel T, Bastide B, Stevens L, Rieger F, and Mounier Y. (2000) Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobbler mouse muscles. *Exp. Neurol.* **162**, 311-320

Bibliographie

Tsokos GC, Nambiar MP, and Juang YT. (2003) Activation of the Ets transcription factor Elf-1 requires phosphorylation and glycosylation: defective expression of activated Elf-1 is involved in the decreased TCR zeta chain gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 240-245

Turner DC, Walliman T, and Eppenberger HM. (1973) A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 702-705

- U -

Uyeda, TQ, Abramson PD, and Spudich JA. (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4459-4464

- V -

Vandekerckhove J, Bugaisky G, and 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

Verbert A, Montreuil J, Bouquelet S, Cacan R, Debray H, Fournet B, Michalski JC, Spik G, Strecker G. (1995) Methods on glycoconjugates – A laboratory manual, Edition Harwood Academic Publishers

Vibert P, and Cohen C. (1988) Domains, motions and regulation in the myosin head. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **9**, 296-305

Vosseller K, Hansen KC, Chalkley RJ, Trinidad JC, Wells L, Hart GW, and 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, Sakabe K, Wells L, and Hart GW. (2002a) Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc : a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 851-857

Vosseller K, Wells L, and Hart GW. (2001) Nucleocytoplasmic O-glycosylation : O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochimie* **83**, 575-581

Vosseller K, Wells L, Lane MD, and Hart GW. (2002b) Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5313-5318

Vulliet PR, Hall FL, Mitchell JP, and Hardie DG. (1989) Identification of a novel proline-

directed serine/threonine protein kinase in rat pheochromocytoma. *J. Biol. Chem.* **264**, 16292-16298

- W -

Wada M, Hamalainen N, and Pette D. (1995) Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibres from rabbit skeletal muscle. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **16**, 237-242

Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, and Buse MG. (2003) High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E424-434

Wallimann T, Turner DC, and Eppenberger HM. (1977) Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* **75**, 297-317

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, and Eppenberger HM. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* **281**, 21-40. Review

Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, and Ramirez-Mitchell MR. (1993) Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscle. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophys. J.* **64**, 1161-1177

Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, and Klip A. (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4008-4018

Warrick HM, and Spudich JA. (1987) Myosin structure and function in cell motility. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **3**, 379-421

Watson MH, Taneja AK, Hodges RS, and Mak AS. (1988) Phosphorylation of alpha alpha- and beta beta-tropomyosin and synthetic peptide analogues. *Biochemistry* **27**, 4506-4512

Weil JH. (1995) "Cycle de Krebs" *Biochimie générale* Edition Masson, pp205-210

Weil JH. (1995) "Glycolyse" *Biochimie générale* Edition Masson, pp185-202

Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, and Hart GW. (1994) 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, and Hart GW. (2003) O-GlcNAc turns twenty : functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* **546**, 154-158

Bibliographie

Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, and Hart GW. (2002) Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell. Proteomics.* **1**, 791-804

Wells L, Vosseller K, and Hart GW. (2003a) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell. Mol. Life. Sci.* **60**, 222-228

Wells L, Whalen SA, and Hart GW. (2003b) O-GlcNAc : a regulatory post-translational modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 435-441

White SP, Cohen C, and Phillips GN Jr. (1987) Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* **325**, 826-828

Whiteman EL, Cho H, and Birnbaum MJ. (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends. Endocrinol. Metab.* **13**, 444-451. *Review*

Whitford M, and Faulkner P. (1992) A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *J. Virol.* **66**, 3324-3329

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

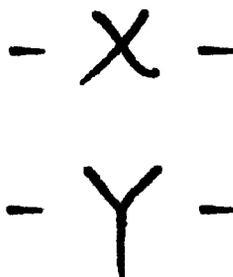
Wilson GL, and Leiter EH. (1990) Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **156**, 27-54. *Review*

Wojtczak L. (1996) The Crabtree effect : a new look at the old problem. *Acta. Biochim. Pol.* **43**, 361-368. *Review*

Wong PC, and Cleveland DW. (1990) Characterization of dominant and recessive assembly-defective mutations in mouse neurofilament NF-M. *J. Cell. Biol.* **111**, 1987-2003

Woods EF. (1967) Molecular weight and subunit structure of tropomyosin B. *J. Biol. Chem.* **242**, 2859-2871

Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, and Wallimann T. (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1102**, 119-166. *Review*



Yaffe MB, and Smerdon SJ. (2001) PhosphoSerine/threonine binding domains: you can't pSERious? *Structure.* **9**, R33-R38. *Review*

Bibliographie

Yamashita K, and Yoshioka T. (1991) Profiles of creatine kinase isoenzyme compositions in single muscle fibres of different types. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **12**, 37-44

Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, and Kudlow JE. (2001) O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 6611-6616

Yang X, Zhang F, and Kudlow JE. (2002) Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell.* **110**, 69-80

Yao PJ, and Coleman PD. (1998) Reduced O-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **252**, 33-36

Yki-Jarvinen H, Virkamaki A, Daniels MC, McClain D, and Gottschalk WK. (1998) Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism* **47**, 449-455

Yki-Jarvinen H, Vogt C, Iozzo P, Pipek R, Daniels MC, Virkamaki A, Makimattila S, Mandarino L, DeFronzo RA, McClain D, and Gottschalk WK. (1997) UDP-N-acetylglucosamine transferase and glutamine: fructose 6-phosphate amidotransferase activities in insulin-sensitive tissues. *Diabetologia.* **40**, 76-81

Yoneda Y, Imamoto-Sonobe N, Yamaizumi M, and Uchida T. (1987) Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp. Cell. Res.* **173**, 586-595

- Z -

Zachara NE, and Hart GW. (2002) The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem. Rev.* **102**, 431-438

Zachara NE, and Hart GW. (2004a) O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends. Cell. Biol.* **14**, 218-221

Zachara NE, and Hart GW. (2004b) 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. Review

Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, and Hart GW. (2004) Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 30133-30142

Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, and Kudlow JE. (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell.* **115**, 715-725

Bibliographie

Zhu W, Leber B, and Andrews DW. (2001) Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.* **20**, 5999-6007

Zot AS, and Potter JD. (1987) Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 535-559

Annexes



Figures et tableaux

FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation.

Figure 2 : Diversité des classes protéiques modifiées par la O-GlcNAc au sein de la cellule.

Figure 3 : La O-GlcNAc : une modification post-traductionnelle dynamique et réversible.

Figure 4 : Compétition entre la phosphorylation et la O-N-acétylglucosaminylation pour une protéine présentant deux sites de modification. La phosphorylation et la O-GlcNAc peuvent modifier un même site ou des sites adjacents. (d'après Akimoto et coll., 2003).

Figure 5 : Mécanismes de régulation possibles de l'OGT : régulation transcriptionnelle et post-traductionnelles, multimérisation et interactions de protéines accessoires ou de substrats avec la région des TPR (d'après Comer & Hart, 2000).

Figure 6 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hexosamines.

Figure 7 : Analogie structurale (en vert) entre la PUGNAc et la streptozotocine, inhibiteurs de la O-GlcNAcase, avec la N-acétyl- β -D-glucosamine.

Figure 8 : Représentation schématique du transport cytosol-noyau impliquant une protéine-O-GlcNAc et un complexe multimérique d'HSP70 jouant le rôle de navette entre le cytosol et le noyau (d'après Guinez et coll., 2004).

Figure 9 : Les étapes de la dégradation protéasomale des protéines polyubiquitinylées.

Figure 10 : Représentation schématique de la voie de signalisation à l'insuline.

Figure 11 : Influence de la O-GlcNAc dans l'induction de la résistance à l'insuline et son intervention dans la voie de signalisation de l'hormone.

Figure 12 : Les différents niveaux d'organisation du tissu musculaire strié, du muscle squelettique à la myofibrille.

Figure 13 : Organisation microscopique du muscle squelettique : le sarcomère.

Figure 14 : (A) Structure hexamérique de la myosine. (B) Organisation des filaments épais de myosine.

Figure 15 : Structure de la MHC avec ses domaines fonctionnels : LMM et HMM, et détail de la tête S1 et de ses trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa (d'après Vibert & Cohen, 1988). (ELC : essential light chain ; RLC : regulatory light chain).

Figure 16 : Arrangement des globules d'actine dans le filament d'actine ; l'assemblage des globules d'actine forme une structure hélicoïdale (d'après Alberts et coll., 1993). L'agrandissement montre la structure d'un globule d'actine constitué de quatre sous-unités.

Figure 17 : Assemblage des molécules d'actine (zone A sur le schéma) et de myosine (zone M sur le schéma). Sont également représentées les trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa de la tête S1 de la méromyosine lourde, ainsi que l'interaction avec la MLC essentielle (ELC sur la figure) et la MLC régulatrice (RLC sur la figure).

Figure 18 : Représentation schématique de la structure du filament fin, avec notamment le filament de tropomyosine (en bleu), qui s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale d'actine, et le complexe des troponines, avec la troponine C (terminaison N-terminale en bleu et terminaison C-terminale en rose), la troponine I (en rouge, la partie inhibitrice étant en jaune) et la troponine T (en vert). La myosine S1 (vert), la chaîne légère essentielle (rouge) et la chaîne légère régulatrice (orange) sont également représentées.

Figure 19 : Représentation schématique de la TnC, avec deux sites calciques occupés en (a) sur les sites III et IV, et tous les sites occupés en (b). Noter la réorientation des hélices B et C par rapport aux hélices A et B.

Figure 20 : Localisation de la TnI au sein du filament fin, représentée en vert, en absence et en présence de calcium. La TnI interagit également avec la TnC (en rouge) et avec la TnT (en bleu).

Figure 21 : Théorie de la contraction musculaire par glissement des filaments et raccourcissement du sarcomère.

Figure 22 : Séquence d'évènements produisant le glissement du filament épais sur le filament fin lors de la contraction musculaire : le cycle ATPasique de la myosine.

Figure 23 : Mécanisme de la régulation calcique de la contraction musculaire. Les différentes étapes numérotées de 1 à 4 correspondent aux mêmes étapes que celles décrites figure 22.

Figure 24 : Représentation schématique des différents acteurs protéiques intervenant dans le cycle excitation-contraction-relaxation.

Figure 25 : Sources d'énergie du muscle squelettique lors du travail musculaire selon la durée de l'exercice exprimée en minutes.

Figure 26 : Pourcentage de la dépense énergétique totale couvert par chacun des métabolismes selon l'activité sportive. (1) ski de fond ; (2) marathon ; (3) marche ; (4) nage libre (1 500 m) ; (5) course (3 000 m) ; (6) course (1 500 m) ; (7) nage libre (200 m) ; (8) course (400 m) ; (9) course (100 m) ; (10) haltérophilie.

Figure 27 : Navette de la créatine kinase.

Figure 28 : Schéma récapitulatif des réactions de la glycolyse.

Figure 29 : Schéma récapitulatif du cycle de Krebs.

Figure 30 : Schéma récapitulatif du métabolisme du glycogène.

Figure 31 : Coupes histologiques d'un muscle squelettique permettant de mettre en évidence les deux types de fibres musculaires, lentes et rapides.

Figure 32 : Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques.

Figure 33 : Exemple d'un cycle expérimental.

Figure 34 : Relation T/pCa .

Figure 35 : Protocoles expérimentaux suivis pour la mise en évidence d'un rôle de la O-GlcNAc dans un processus d'interaction protéine-protéine.

Figure 36 : Principe de l'analyse des protéines par approche protéomique.

Figure 37 : Electrophorèse monodimensionnelle 10-20% des glycoprotéines musculaires purifiées sur colonne de WGA. (A) Coloration au nitrate d'argent ; (B) Révélation WGA-peroxydase avant désialylation chimique ; (C) Révélation WGA-peroxydase après désialylation chimique ; (D) Révélation WGA-peroxydase en présence de 0,2 M GlcNAc ; (E) Révélation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc RL-2.

Figure 38 : Electrophorèses bidimensionnelles d'un pool total de protéines du gastrocnemius (300 µg de protéines déposées (en A)) et de protéines-O-GlcNAc purifiées sur colonne de WGA (B : coloration au nitrate d'argent ; C : révélation à la WGA-peroxydase après désialylation chimique). Les protéines identifiées sont numérotées de 1 à 14 sur le gel B.

Figure 39 : Empreintes peptidiques de deux protéines-O-GlcNAc. (A) : créatine kinase ; (B) : β -énolase.

Figure 40 : Isoformes de protéines-O-GlcNAc identifiées sur l'électrophorèse bidimensionnelle. (1) β -énolase ; (2) : fructose-bisphosphatase aldolase ; (3) : créatine kinase.

Figure 41 : Analyse de la modification par O-GlcNAc des isoformes de chaînes lourdes de myosine. Les différentes isoformes sont détectées soit par coloration au nitrate d'argent (A), ou par révélation avec l'anticorps anti-O-GlcNAc en l'absence (B) ou en présence (C) de 0,2 M de GlcNAc.

Figure 42 : Electrophorèse mono-dimensionnelle de protéines-O-GlcNAc purifiées par immunoprécipitation à partir du soleus. Coloration au nitrate d'argent. (A) Pool protéique total ; (B) protéines-O-GlcNAc.

Figure 43 : (A) Spectre MALDI-TOF de l'ATP synthase. (B) Spectres de fragmentation des peptides de masse 1088,6052 et 1262,6685 et séquences correspondantes.

Figure 44 : Schéma représentatif de l'implication des protéines-O-GlcNAc identifiées au sein du métabolisme cellulaire.

Figure 45 : Variation de la masse du muscle exprimée par rapport à la masse de l'animal (unité arbitraire). Les données sont indiquées \pm SEM, $n=6$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$).

Figure 46 : Chromatographie sur couche mince des glycanes des protéines musculaires libérés par action de la PNGase F et β -élimination en milieu réducteur. (A) Révélation à l'orcinol sulfurique ; (B) Autoradiographie des produits tritiés.

Figure 47 : Variations du taux global de O-GlcNAc dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie hypokinésie. Le taux de O-GlcNAc est exprimé en ng de O-GlcNAc pour 100 μ g de protéines musculaires. Les données sont indiquées \pm SEM, $n=6$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$).

Figure 48 : Activité de la O-GlcNAc transférase dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'activité est exprimée en pmol de O-GlcNAc transférées par minute et pour 100 μ g de protéines musculaires. Les données correspondant à des expériences réalisées en duplicate sont indiquées \pm SEM, $n=3$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$).

Figure 49 : Activité de la O-GlcNAcase dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. L'activité est exprimée en pmol de PNP libéré/minute/100 μ g de protéines musculaires. Les données correspondant à des expériences réalisées en duplicate sont indiquées \pm SEM, $n=3$ pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes ($p<0,05$).

Figure 50 : Analyse des ARNm de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase déterminées après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie. Analyse PCR de l'expression de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase dans le soleus (en 1 et en 3) et dans l'EDL (en 2 et en 4) respectivement dans des conditions contrôle.

Figure 51 : Analyse densitométrique de l'expression des transcrits de la O-GlcNAc transférase et de la O-GlcNAcase dans le soleus (en noir) et dans l'EDL (en gris) après 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie par comparaison avec le contrôle. L'intensité des signaux est corrigée par rapport au signal de la GAPDH obtenu pour les mêmes échantillons afin de corriger les variations liées à l'extraction, et les valeurs après hypodynamie-hypokinésie sont normalisées par rapport au contrôle. Les données sont indiquées \pm SEM, $n=5$ pour chaque groupe.

Figure 52 : Chromatogramme obtenu après séparation par HPLC des composés obtenus par

hydrolyse acide de 200 µg de protéines musculaires et mesure de la concentration des ions phosphates par conductimétrie.

Figure 53 : *Variations du taux global de phosphate dans le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie hypokinésie. Le taux de phosphate est exprimé en ng pour 100 µg de protéines musculaires. Les données correspondant à des expériences réalisées en duplicate sont indiquées ± SEM, n=3 pour chaque groupe.*

Figure 54 : *Comparaison de l'intensité du signal d'HSP70 entre le soleus (S_C) et l'EDL (E_C) dans les conditions contrôles. Les mesures ont été effectuées sur le même blot, n=3 échantillons. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes (p<0,05).*

Figure 55 : *Comparaison de l'expression d'HSP70 entre le soleus et l'EDL après 14 et 28 jours d'hypodynamie-hypokinésie par rapport au contrôle. Les mesures ont été effectuées sur le même blot, n=3 échantillons. Les données sont indiquées ± SEM, n=4 pour chaque groupe. Le symbole * représente les différences significatives entre les groupes (p<0,05).*

Figure 56 : *Enrichissement d'un échantillon de gastrocnemius en protéines contractiles. (1) protéines totales ; (2) protéines contractiles.*

Figure 57 : *SDS-PAGE 10-20 % et coloration au nitrate d'argent des protéines contractiles purifiées sur colonne de WGA-immobilisée à partir du muscle lent soleus (en A) et du muscle rapide EDL (en B).
1 : protéines contractiles ; 2 : lavage GalNAc 0,5 M ; 3 : élution GlcNAc 0,5 M.*

Figure 58 : *Analyse par chromatographie en phase gazeuse des alditols acétates libérés d'une protéine préalablement séparée par SDS-PAGE. (A) Chromatogramme obtenu pour la bande protéique correspondant à la MLC2s ; (B) Spectre de fragmentation obtenu par analyse en chromatographie en phase gazeuse du composé de temps de rétention 32,1 minutes.*

Figure 59 : *SDS-PAGE 10-20 % et coloration au nitrate d'argent des protéines contractiles purifiées sur colonne de GlcNAc-immobilisée à partir du muscle lent soleus (en A) et du muscle rapide EDL (en B).
1 : protéines contractiles ; 2 : lavage GalNAc 0,5 M ; 3 : élution GlcNAc 0,5 M.*

Figure 60 : *Principe de la détermination des sites de O-GlcNAc. En rouge est représentée la méthodologie utilisée pour la protéine « froide », et en vert celle utilisée pour la protéine radiomarquée.*

Figure 61 : *Profil chromatographique obtenu après séparation par HPLC des peptides tryptiques de la MLC2s. Le symbole * correspond aux fractions radiomarquées, et donc contenant le (ou les) peptide(s) glycosylé(s), respectivement les fractions 58 et 59.*

Figure 62 : *Analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF des fractions 58 (en A) et 59 (en B) obtenues après séparation des peptides tryptiques de la MLC2s par*

HPLC en phase inverse.

Figure 63 : Séquence protéique de la MLC2s. En vert sont indiqués les peptides porteurs de O-GlcNAc et en rouge les sites potentiels de cette modification post-traductionnelle. Sont également indiqués les motif EF-hand, sensibles au calcium : EF-hand 1 ; EF-hand 2 ; EF-hand 3.

Figure 64 : Détermination des caractéristiques d'activation calcique avec la relation Tension/pCa d'une fibre lente (trait plein) et d'une fibre rapide (trait discontinu). La pente de la relation (vert) est ajustée à l'aide de l'équation de Hill (d'après Kischel, 2000).

Figure 65 : SDS-PAGE 10-20 % de protéines musculaires O-GlcNAc fixées sur billes de WGA (en A) ou protéines musculaires restant fixées sur les billes après une élution par 0,2 M de N-acétylglucosamine (en B).
(1) biopsie pelée de deux semaines ; (2) biopsie pelée de quatre semaines ; (3) homogénat de soleus.

Figure 66 : SDS-PAGE 10-20% de protéines musculaires purifiées sur billes de GlcNAc-immobilisées. Protéines totales en (A) ; Protéines fixées sur billes de GlcNAc en (B) ; Protéines restant fixées sur les billes de GlcNAc après élution par 0,05 M de GlcNAc en (C), 0,2 M de GlcNAc en (D) ou 0,5 M de GlcNAc en (E).

Figure 67 : Relation T/pCa des fibres musculaires obtenue après une incubation unique d'une heure (en A) ou après deux incubations successives d'une heure (en B) dans une solution de glycérol 0,2 M.

Figure 68 : Mesures des tensions sous-maximales P et maximales P₀ après une incubation de la fibre musculaire dans une solution de 0,2 M GlcNAc (n = 3).

Figure 69 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

Figure 70 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M.

Figure 71 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

Figure 72 : Profil électrophorétique de fibres musculaires contrôle (en 1), ou incubées dans une solution de GalNAc 0,2 M (en 2), de GlcNAc 0,2 M (en 3) ou de glycérol 0,2 M (en 4).

Figure 73 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de WGA à 0,1 mg/ml.

Figure 74 : Schéma représentant l'interaction entre le filament épais et la filament fin. Le motif ♦ représente les protéines-O-GlcNAc et le motif ◆ les protéines présentant une activité lectinique vis-à-vis du motif O-GlcNAc.

Figure 75 : Représentation schématique de la MLC2 au niveau de la structure du domaine régulateur de la tête S1 de la MHC (d'après Houdusse et coll., 1996).

TABLEAUX

Tableau I : Les principaux types de glycosylation.

Tableau II : Tableau récapitulatif des protéines-O-GlcNAc identifiées à ce jour.

Tableau III : Exemples de séquences peptidiques de O-N-acétylglucosaminylation.

Tableau IV : Caractéristiques fonctionnelles, métaboliques et structurales des fibres lentes et des fibres rapides.

Tableau V : Isoformes des protéines myofibrillaires MHC, actine, troponines, tropomyosine et MLC selon le type de muscle.

Tableau VI : Proportions relatives d'un type de fibres donné selon le muscle considéré (d'après Delp & Duan, 1996).

Tableau VII : Protéines-O-GlcNAc protéines identifiées dans le gastrocnemius (après purification sur colonne de WGA, séparation par électrophorèse bidimensionnelle et analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF).

Tableau VIII : Protéines-O-GlcNAc identifiées dans le soleus (après immunoprécipitation, séparation par électrophorèse mono-dimensionnelle et analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Le symbole (*) indique les protéines dont l'identité a été confirmée par MS-MS.

Tableau IX : Séquences peptidiques obtenues par fragmentation MS-MS de peptides, permettant de confirmer l'identité de la protéine après analyse en spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

Tableau X : Tableau récapitulatif des résultats obtenus après analyse des alditols acétates libérés d'une protéine. Les résultats indiquent la présence d'un composé de temps de rétention 32,1 minutes, l'identité de ce composé étant confirmée par GC-MS.

Tableau XI : Identification des protéines contractiles lectines à O-GlcNAc par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Leur modification par la O-GlcNAc est également indiquée.

Tableau XII : Peptides de la MLC2s retrouvés dans les fractions HPLC 58 et 59. Sont indiqués la masse (m/z) du pic concerné ainsi que la séquence peptidique

correspondante.

Tableau XIII : *Pics du spectre MALDI expérimental correspondant aux peptides glycosylés de la MLC2s.*

Tableau XIV : *Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de sept fibres musculaires après une et deux incubations dans une solution de glycérol 0,2 M.*

Tableau XV : *Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de onze fibres musculaires après une incubation dans une solution de GlcNAc 0,2 M.*

Tableau XVI : *Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de trois fibres musculaires après une incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M.*

Tableau XVII : *Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de quatre fibres musculaires après une incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation dans une solution de GlcNAc 0,2M.*

Tableau XVIII : *Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité au sein des myofilaments de deux fibres musculaires après une incubation dans une solution de WGA 0,1 mg/ml.*

