

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
N° 4289

U.F.R. DE BIOLOGIE

THÈSE

De Doctorat d'Université

Présentée par

Julie Hédou

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 »

**Analyses fonctionnelle et protéomique du rôle
de la O-N-Acétylglucosaminylation dans la
physiologie du muscle squelettique**

Soutenue publiquement le 05 décembre 2008 devant la commission d'examen

Mme Dominique Desplanches

Chargé de Recherche 1^{ère} Classe CNRS, Lyon 1

Rapporteur

Mme Corinne Huchet-Cadiou

Maître de conférences CNRS, Nantes

Rapporteur

Mr. Maurice Falempin

Professeur des Universités, Lille I

Examineur

Mr. Willy Morelle

Maître de conférences CNRS, Lille 1

Examineur

Mr. Dominique Lombardo

Maître de Conférences INSERM, Marseille

Examineur

Mr. Bruno Bastide

Professeur des Universités, Lille 1

Directeur

Résumé

La *O*-N-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc, est une glycosylation cytosolique et nucléaire correspondant à l'addition d'un motif *O*-GlcNAc sur des résidus sérine et thréonine des protéines. Cette glycosylation dynamique et réversible est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, le cycle cellulaire, la signalisation intracellulaire... mais également dans des pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives et le diabète. Peu de travaux se sont intéressés au rôle que la *O*-GlcNAc pourrait jouer dans le muscle strié. Pourtant, le muscle squelettique est un modèle intéressant pour l'étude de la *O*-GlcNAc, puisque son métabolisme dépend fortement du glucose, que de nombreux processus musculaires, tels que la contraction, dépendent de la phosphorylation et qu'il peut adapter son métabolisme énergétique aux conditions physiologiques. Or, la *O*-GlcNAc est à la fois dépendante du taux de glucose mais peut également interférer avec la phosphorylation par l'intermédiaire d'une balance phosphorylation/ *O*-N-acétylglucosaminylation.

Nous avons identifié un grand nombre de protéines modifiées par la *O*-GlcNAc, en particulier les chaînes lourdes et légères de myosine, l'actine et la tropomyosine. L'analyse du rôle de la *O*-GlcNAc sur l'activité contractile, et en particulier sur la sensibilité calcique des fibres musculaires, démontre que cette glycosylation pourrait jouer un rôle modulateur dans l'activité contractile des fibres musculaires via des interactions protéine-protéine mais également des motifs qui ne sont pas engagés dans des interactions. Nous avons identifié plusieurs sites *O*-GlcNAc sur deux protéines clés de la machinerie contractile du muscle squelettique, l'actine et la myosine. Un site a été localisé sur la séquence 198-207 de l'actine et quatre autres ont été identifiés dans la partie hélicoïdale de la région carboxy-terminale de la myosine et correspondent aux séquences 1094-1106 ; 1295-1303 ; 1701-1712 ; 1913-1922. Ces sites pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine, dans la polymérisation des protéines et également jouer un rôle dans la modulation des propriétés contractiles du muscle squelettique. Enfin, nous mettons en évidence la possible implication de la *O*-GlcNAc dans un modèle d'atrophie fonctionnelle (Bed-rest) chez l'humain. En premier lieu, nous avons démontré l'existence d'une balance phosphorylation/*O*-GlcNAc de la MLC₂ au cours de l'atrophie musculaire. Cette balance pourrait moduler l'activité ou les propriétés de cette protéine au rôle important dans la modulation de la force de contraction. En outre, l'analyse du taux global de *O*-GlcNAc suggère que le taux de *O*-GlcNAc est lié au développement de l'atrophie musculaire. L'ensemble de ces résultats démontre que la *O*-GlcNAc joue un rôle qui pourrait être tout autant important dans la physiologie musculaire que la phosphorylation.

Abstract :

The *O*-linked N-acetylglucosaminylation termed *O*-GlcNAc is a dynamic cytosolic and nuclear glycosylation on serine and threonine residus. This dynamic and reversible glycosylation is involved in many physiological as well as pathological processes such as diabetes, neurodegenerative diseases, cancer or cardiac ischemia. Only few studies have been performed about the role of *O*-GlcNAc in skeletal muscle.

However, the skeletal muscle is an interesting model to study the *O*-GlcNAc since i) its metabolism depends on glucose, ii) many muscular processes such as contraction are dependent on phosphorylation, and iii) there is a plasticity of the muscle metabolism depending on the physiological conditions. *O*-GlcNAc is dependent also on the level of glucose and can interfere with phosphorylation through a phosphorylation/glycosylation balance.

We clearly demonstrated that a number of key contractile proteins i.e myosin heavy and light chains and actin are *O*-GlcNAc modified. The role of this post-translational modification in the contractile properties was investigated by establishing T/pCa curves on skinned fibers. This study demonstrated that *O*-GlcNAc moieties involved in protein-protein interactions or not could modulate calcium activation properties and therefore that *O*-GlcNAc motifs could be involved in the modulation of contractile force. Using a mass spectrometry-based method, we determined the localization of one *O*-GlcNAc site in the subdomain 4 of actin (séquence 198-207) and four *O*-GlcNAc sites in the light meromyosin region of myosin heavy chains (séquences 1094-1106 ; 1295-1303 ; 1701-1712 ; 1913-1922). These sites might be involved in protein-protein interactions or in the polymerization of MHC or could modulate the contractile properties of skeletal muscle. Finally, we studied the implication of *O*-GlcNAc in a human model of muscle atrophy (Bed-Rest). We demonstrated the existence of a phosphorylation/*O*-GlcNAc balance for MLC₂ that could modulate the activity and properties of this protein which has a key role in the modulation of force. Moreover, our data suggested that *O*-GlcNAc level might be involved in the control of protein homeostasis and muscular atrophy in human as in rat. All these data demonstrate that *O*-GlcNAc is an important post-translational modification in the muscle physiology.

A ma fille Gabrielle,

A Jérôme, à mes parents,

Pour tout leur amour et leur soutien

A ma grand-mère,

A ma famille...

Ce travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé sous la direction du Professeur Bruno Bastide au laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, dans l'Unité de Neurosciences et Physiologies Adaptatives (UPRES EA 4052).

Ce travail a bénéficié d'une allocation de recherche du Centre National d'Études Spatiales (CNES).

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs M. Falempin et Y. Mounier pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. Maurice, je vous remercie d'avoir accepté de présider aujourd'hui mon jury de thèse et de m'avoir fait confiance tout au long de ces années de DEA puis de thèse. Yvonne, un grand merci pour toutes ces discussions scientifiques, très enrichissantes et pour avoir participé à l'écriture de mon manuscrit de thèse. J'ai passé de très bons moments en votre compagnie et espère garder de vos nouvelles.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Bruno Bastide pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique.

Mes remerciements vont à D. Desplanches et C. Cadiou pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury afin de juger mon travail. J'associe à ces remerciements W. Morelle et D. Lambardo pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens à remercier plus particulièrement Willy pour avoir accepté de travailler avec moi sur un sujet très difficile. J'ai beaucoup appris grâce à toi en biochimie et en spectrométrie de masse. Je t'apprécie énormément et espère qu'on gardera contact.

Je tiens à remercier les personnes m'ayant apporté leur aide technique, en particulier Adeline Page pour la MS-MS, Laetitia pour les dosages, Valérie pour les fibres pelées et Willy pour la technique BEMAD. Merci à Tony pour m'avoir aidée à restructurer la partie O-GlcNAc de ce mémoire.

Je tiens à remercier chaleureusement Caroline pour ses nombreux conseils en biochimie.

Je remercie tous les membres de mon équipe : Laurence, Florence, Marie-Hélène, Erwan... Merci pour votre amitié et pour les bons moments passés ensemble! Une pensée aussi à Fred, Yoann, Djamel, Louk, Valegh et les autres membres du C9 que j'ai pu côtoyer.

Je remercie également le Centre National d'Études Spatiales pour son soutien financier.

Evidemment, je remercie chaleureusement et sans compter mes parents sans qui mes années universitaires auraient été beaucoup plus ardues, et Jérôme, pour son soutien à toute épreuve... Sans vous, je n'en serai pas là aujourd'hui...Merci à Kevin, Céline et leurs enfants pour tous les bons moments passés ensemble, et aussi et surtout à ma petite puce, Gabrielle qui est le moteur de ma Vie.

PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS

P1. Hédou J, Cieniewski-Bernard C, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y, Bastide B. (2007)

“O-Linked N-Acetylglucosaminylation Is Involved in the Ca²⁺ Activation Properties of Rat Skeletal Muscle”

Journal of Biological Chemistry.14:10360-10369.

P2. Hédou J, Bastide B, Adeline Page, Morelle Willy. (2008) “Mapping of O-linked β-N-Acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle”

Proteomics (soumis).

C1. Hédou J. (CNES, Lille), Cieniewski-Bernard C. (INSERM, Lille), Bastide B. (USTL, Lille), Mounier Y. (USTL, Lille).

“O-GlcNAc Is A Post-Translational Modification Involved In The Development Of Atrophy And Regulation Of The Contractile Activity In Rat Skeletal Muscle”

27th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Osaka (Japan), 23-28 April 2006.

C2. Hédou J. (CNES, Lille), Cieniewski-Bernard C. (INSERM, Lille), Leroy Y. (CNRS, Lille), Stevens L. (USTL, Lille), Falempin M. (USTL, Lille), Michalski JC. (CNRS, Lille), Mounier Y. (USTL, Lille), Bastide B. (USTL, Lille).

“Implication Of O-Linked N-Acetylglucosaminylation In The Contractile Activity In Skeletal Muscle”

16th meeting of Methods in Protein Structural Analysis, Lille (France), 29 August-2 September 2006.

C3. Hédou J. (CNES, Lille), Cieniewski-Bernard C. (INSERM, Lille), Leroy Y. (CNRS, Lille), Michalski JC. (CNRS, Lille), Mounier Y. (USTL, Lille), Bastide B.(USTL, Lille).

“O-GlcNAc Is A Post-Translational Modification Involved In The Modulation Of The Contractile Activity In Rat Skeletal Muscle”

European Muscle congress, Heidelberg (Allemagne), 9-12 September 2006.

C4. Mounier Y. (USTL, Lille), Tiffreau V (CHR, Lille), Montel V. (USTL, Lille), Cochon L. (USTL, Lille), Hédou J. (CNES, Lille), Bastide B. (USTL, Lille), Stevens L. (USTL, Lille).

“Changes In Regulatory Protein Expression During A Long-Term Bed-Rest”

Symposium at Canadian Space Agency, Montreal (Canada), 28 November-02 December 2006.

C5. Mounier Y., **Hédou J.**, Montel V., Dupont E., Bastide B. and Stevens L.

“Consequences of WISE Bed rest on myosin expression and post-translational modifications”

28th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 8-13 April, 2007, Menger Hotel, San Antonio, TX, USA.

C6. Hédou J., Morelle W, Page A, Bozzo C, Cieniewski-Bernard C, Michalski JC, Falempin M, Bastide B.

“O-N-Acetylglycosaminylation is involved in the contractile activity of skeletal muscle”

European Muscle congress, Stockholm, 8-12 September 2007.

SOMMAIRE

Chapitre I : Introduction Générale

Chapitre II : Historique du sujet

I – Le muscle squelettique.....	3
I – A. Structure du muscle.....	3
I – B. Structure des fibres musculaires.....	6
I – C. Structure des myofibrilles.....	7
I – D. Les protéines contractiles motrices.....	9
1) L'actine.....	9
a) L'actine monomérique.....	10
i) Structure.....	10
ii) Fonctions de l'actine monomérique.....	11
b) Le polymère d'actine.....	13
2) La myosine.....	15
a) Structure.....	15
i. Structure de la MLC_2	19
ii. Fonctions de la MLC_2	20
b) Famille multigénique	20
c) Les protéines associées à la myosine.....	22
3) Principe général du mécanisme de la contraction musculaire - Le cycle ATPasique de la myosine	23
a) Théorie de la contraction par glissement des filaments	23
b) Le cycle ATPasique de la contraction : le modèle des ponts actomyosine : le « swinging crossbridge »	24
c) Régulation calcique de la contraction musculaire.....	27
1) Les protéines régulatrices.....	27
a) La tropomyosine	27
i. Structure	27
ii. Polymorphisme	28
iii. Etat « on » et « off » de la Tm.....	28

b) La troponine I	31
i. Structure	31
ii. Polymorphisme	31
iii. Fonctions	31
c) La troponine T	35
i. Structure	35
ii. Polymorphisme	35
iii. Fonctions	37
d) La troponine C	40
i. Structure	40
ii. Polymorphisme	41
iii. Fonctions	42
2) Mécanisme filamentaire de la contraction	44
<u>I – E. La plasticité musculaire : transitions entre les différents types de fibres musculaires : plasticité musculaire</u>	46
1) Polymorphisme des fibres squelettiques	46
2) Le muscle, une structure plastique	47
3) Plasticité des fibres musculaires squelettiques dans le modèle d'hypodynamie-hypokinésie (HH)	48
4) Plasticité des fibres musculaires squelettiques dans le bed-rest	49
II – La O-N-Acétyleglucosaminylation	52
<u>II – A. Introduction</u>	52
<u>II – B. La O-N-acétyleglucosaminylation : la O-GlcNAc</u>	53
1) La O-GlcNAc se démarque des autres types de glycosylation	60
a) La découverte de la O-GlcNAc	53
b) La O-GlcNAc, une modification post-traductionnelle dynamique	55
c) La O-GlcNAc est localisée majoritairement dans le cytosol et le noyau mais peut-être aussi dans les mitochondries	55
d) La O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle ubiquitaire et très conservée	56
e) La O-GlcNAc ne nécessite pas de séquence peptidique consensus	56
2) Les processus de O-N-acétyleglucosaminylation sont régulés par un couple d'enzymes	57
a) La O-GlcNAc transférase (OGT) greffe le résidu de GlcNAc sur les protéines substrats	58

b) La <i>O</i> -GlcNAcase hydrolyse le résidu de GlcNAc des protéines modifiées	60
c) Le résidu de GlcNAc provient de la voie métabolique des hexosamines et en partie du glucose extracellulaire	63
<u>II – C. Les fonctions supposées de la <i>O</i>-GlcNAc</u>	64
1) La <i>O</i> -GlcNAc : une modification analogue ou antagoniste à la phosphorylation/Théorie du « ying-yang »	66
2) La <i>O</i> -GlcNAc module les interactions protéine-protéine	68
3) La <i>O</i> -GlcNAc intervient aussi dans la transcription	69
4) La <i>O</i> -GlcNAc régule le cycle cellulaire	70
5) La <i>O</i> -GlcNAc : un signal de rétention nucléaire	71
a) Généralités sur le transport nucléaire	82
b) La <i>O</i> -GlcNAc et le transport nucléaire	83
6) La <i>O</i> -GlcNAc protège les protéines de la dégradation protéasomale	73
a) La glycosylation des protéines augmente leur demi-vie	73
b) Le protéasome lui-même <i>O</i> -GlcNAc	74
<u>II – D. Implications de la <i>O</i>-GlcNAc dans les maladies humaines</u>	76
1) La <i>O</i> -GlcNAc et les maladies neurodégénératives : le cas d'Alzheimer	76
2) La <i>O</i> -GlcNAc et le diabète de type II	77
a) Rappel sur la signalisation de l'insuline	77
b) La <i>O</i> -GlcNAc et le diabète	77
III – La phosphorylation	80
<u>III – A. Introduction</u>	80
<u>III – B. Mécanismes moléculaires impliqués dans la phosphorylation de la MLC₂</u>	80
1) La MLCK (Myosin Light Chain kinase)	81
2) La MP (Myosin Phosphatase)	82
<u>III – C. Effets de la phosphorylation de la MLC₂ sur la potentialisation de la force de contraction du muscle strié squelettique</u>	82

1) Mise en évidence	82
2) Le mécanisme de la phosphorylation	84
<u>III – D. La phosphorylation et la commande nerveuse</u>	<u>85</u>
<u>III – E. La phosphorylation et la plasticité neuromusculaire</u>	<u>86</u>

Chapitre III : Matériels et Méthodes

<u>I. Matériel biologique</u>	<u>89</u>
I – A. L'Homme	89
I – B. Rats (Souche Wistar)	90
I – C. Les muscles étudiés	90
I – D. Protocole de prélèvements	91
<u>II. Détermination des relations Tension/pCa (T/pCa)</u>	<u>91</u>
II – A. Protocole de pelage	91
II – B. Isolement des fibres et mise en évidence dans le dispositif d'enregistrement.....	92
II – C. Enregistrement des tensions isométriques	93
II – D. Expression des résultats	94
II – E. Rôle de la <i>O</i> -GlcNAc sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires	95
1) Mise en évidence d'un éventuel rôle de la <i>O</i> -GlcNAc dans un processus d'interaction protéine-protéine	95
2) Mise en évidence d'un éventuel rôle des motifs <i>O</i> -GlcNAc libres sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires	96
II – F. Composition des solutions	97
II – G. Analyses statistiques	97
<u>III. Techniques électrophorétiques</u>	<u>98</u>
III – A. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse monodimensionnelle	98
III – B. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse bidimensionnelle	98
III – C. Electrophorèse monodimensionnelle	99
III – D. Electrophorèse bidimensionnelle ou 2D	99
1) La première dimension : l'isoélectrofocalisation (IEF)	100

2) Protocole de rééquilibration	102
III – E. Coloration au Nitrate d'argent	103
III – F. Coloration au bleu de Coomassie	103
III – G. Analyse des spots	104
<u>IV. Technique de Western Blot</u>	104
IV – A. Transfert sur membrane de nitrocellulose	104
IV – B. Marquage aux anticorps pour la glycosylation	104
1) Révélation à la WGA	104
2) Révélation avec le RL-2	105
<u>V. Identification des sites O-GlcNAc par la BEMAD</u>	105
V – A. Oxydation performique	106
V – B. Trypsine	106
V – C. Digestion à la phosphatase	107
V – D. Digestion par la β -hexosaminidase	107
V – E. Sep pack C ₁₈	107
V – F. Bemad	108
V – G. Colonne Thiol	108
V – H. Zip-Tip	108
<u>VI. Identification des protéines par spectrométrie de masse</u>	109
VI – A. Réduction – Alkylation	109
VI – B. Digestion « en gel »	109
VI – C. Extraction des peptides	110
VI – D. Microdessalage sur Zip-Tip C18	110
VI – E. Spectrométrie de masse	110
1) Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	110
2) Spectrométrie de masse en tandem	111
<u>VII. Détermination du taux global de O-GlcNAc</u>	113
VII – A. Autogalactosylation de la galactosyltransférase	113
VII – B. Dosage du taux de O-GlcNAc	113
VII – C. Vérification de la spécificité du marquage	113

Chapitre IV : Les résultats

Partie I : La O-GlcNAc et les protéines contractiles : identification et caractéristiques fonctionnelles

<u>I. Problématique</u>	116
<u>II. Les résultats</u>	116
II – A. Purification des protéines contractiles modifiées par la O-GlcNAc	116
1) Purification des protéines contractiles	116
2) Purification des protéines contractiles à O-GlcNAc	117
3) Confirmation de la nature O-GlcNAc des protéines contractiles	120
II – B. Rôles des motifs O-GlcNAc entrant dans des interactions protéiques dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires	122
1) Pourquoi étudier les caractéristiques d'activation calcique ?	122
2) Rôles de la O-GlcNAc dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires	123
a) Caractérisation de la glycosylation des biopsies	123
b) Effet de l'hyperosmolarité sur la sensibilité calcique	124
c) Influence de la GlcNAc sur les valeurs P et Po	126
d) Effet de la O-GlcNAc sur la sensibilité calcique	126
e) Profil électrophorétique des fibres incubées en présence de glycérol, de GalNAc ou de GlcNAc	131
II – C. Rôles des motifs O-GlcNAc « libres » dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires	132
<u>III. Discussion</u>	134

Partie II : Identification des sites O-GlcNAc par une approche biochimique, la BEMAD.

<u>I. Problématique</u>	138
-------------------------------	-----

<u>II. Les résultats</u>	139
1) Enrichissement des protéines contractiles	139
2) Stratégie d'identification des sites <i>O</i> -GlcNAc par une approche biochimique : la BEMAD	140
3) Sites <i>O</i> -GlcNAc.....	141

<u>III. Discussion</u>	148
------------------------------	-----

Partie III : La *O*-GlcNAc et l'atrophie musculaire (le bed-rest)

<u>I. Problématique</u>	152
-------------------------------	-----

<u>II. Les résultats</u>	153
--------------------------------	-----

II – A. Le bed-rest : un modèle d'atrophie musculaire.....	153
--	-----

1) Caractérisation de l'atrophie.....	153
---------------------------------------	-----

2) Propriétés d'activation calcique des fibres PRE BR et POST BR	154
---	-----

3) Rôle de la <i>O</i> -GlcNAc sur les paramètres d'activation calcique des fibres PRE et POST BR de soleus.....	155
---	-----

II – B. Taux global de la <i>O</i> -GlcNAc	157
--	-----

II – C. Une balance <i>O</i> -GlcNAc/phosphorylation pourrait réguler l'activité de la MLC ₂	158
--	-----

1) Les changements phénotypiques de la MLC ₂ au cours du bed-rest	160
---	-----

2) Variations de la phosphorylation de la MLC ₂	160
--	-----

3) Variations de l'état de glycosylation de la MLC ₂ au cours du bed- rest	164
--	-----

<u>III. Discussion</u>	166
------------------------------	-----

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives

I. Identification des protéines contractiles et rôle de la <i>O</i> -GlcNAc dans la contraction musculaire.....	172
--	-----

II. Identification des sites <i>O</i> -GlcNAc par la BEMAD	174
III. Implication de la <i>O</i> -GlcNAc dans la physiologie contractile humaine	175

Chapitre VI : Références bibliographiques

ANNEXES

TABLEAUX ET FIGURES

Tableau I : *Coloration des différents types de fibres en fonction de pH.*

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

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

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

Tableau V : *Récapitulatif des différents types de O-Glycoprotéines.*

Tableau VI : *Vingt deux faits marquants dans l'histoire de la O-GlcNAc.*

Tableau VII : *Récapitulatif des caractéristiques des enzymes de la O-GlcNAc.*

Tableau VIII : *Exemples de protéines O-GlcNAc (d'après Zachara et coll., 2006).*

Tableau IX : *Liste des facteurs de transcription modifiés par la O-GlcNAc (d'après Zachara et coll., 2004).*

Tableau X : *Composition des solutions R, C et W.*

Tableau XI : *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 XII : *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 XIII : *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 XIV : *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 XV : 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 0,2 M.

Tableau XVI : 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.

Tableau XVII: Peptide identifications derived from the BEMAD analysis of contractile proteins.

LC-MS/MS analysis of peptide digests resulting from performic acid oxidation, trypsin digestion, phosphatase treatment, BEMAD labeling with dithiothreitol, and thiol affinity chromatography identified several peptides with a DTT tag. The data were analyzed using the Mascot database and manual inspection allowing for serine and threonine residues to be modified by 136.2 daltons. z, charged state; Xcorr, confidence score for peptide identification.

Tableau XVIII : Diamètres, forces maximales absolues (P_o) et forces spécifiques (P_o/CSA) des fibres lentes et rapides de soleus et de VL des groupes BR et BR+EXO avant (PRE) et après (POST) le bed-rest. Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre de fibres. * Différences statiques entre les valeurs PRE et POST BR ($p < 0,05$).

Tableau XIX : Paramètres d'activation calciques des fibres POST BR par rapport aux fibres PRE BR du soleus. * $p < 0,05$.

Tableau XX : Paramètres d'activation calcique de fibres isolées de biopsies PRE BR exposées à 0,2 M de GlcNAc ($n=7$). # $p < 0,01$

Tableau XXI : Paramètres d'activation calcique de fibres isolées de biopsies POST BR exposées à 0,2 M de GlcNAc ($n=5$). # $p < 0,01$

Tableau XXII: Proportion relative de chaque variant des isoformes de la MLC_2 dans le soleus en conditions BR et BR+EXO. Les données, obtenues par densitométrie des westerns blot anti MLC_2 des gels électrophorétiques 2D, représentent le pourcentage de la distribution des variants de la MLC_2 par rapport au total en MLC_{2s} ou en MLC_{2f} . * $p < 0,05$.

Tableau XXIII: Etats de glycosylation des différents isoformes de la MLC_2 avant et après le bed-rest pour les sujets du groupe BR et BR+EXO. ** $p < 0,02$.

Tableau XXIV : Récapitulatif des variations en expression, en glycosylation et en phosphorylation des variants de la MLC_2 en conditions BR et BR+EXO. * $p < 0,05$.

Figure 1 : Du muscle à la biologie moléculaire de la contraction : structure du muscle strié (d'après Kischel, 2000).

Figure 2 : Photographies des coupes transversales représentatives de la typologie du muscle soleus de rat Contrôles. IIA : fibre rapide de type IIA, IIC : fibre hybride de type IIC, I : fibre lente de type I.

Figure 3 : Organisation d'une fibre musculaire striée.

- a - Photomicrographie d'une portion de deux fibres musculaires (x 250).
 - b - Schéma d'une portion de fibre comportant de nombreuses myofibrilles.
 - c - Schéma d'une portion de myofibrille montrant la succession de sarcomères.
 - d - Schéma de la disposition des filaments fins et épais au sein d'un sarcomère.
 - c - Coupes transversales réalisées à différents endroits d'un sarcomère.
- (d'après Kischel, 2000).

Figure 4 : Photomicrographie d'un sarcomère (x 20 000) : au repos (1), en contraction partielle (2), en contraction complète (3).

Les stries Z délimitent le sarcomère. Bande A, anisotrope dont la longueur ne varie pas au cours de la contraction. Bande I, isotrope dont la longueur varie en fonction du degré de contraction (d'après Marieb, 1993).

Figure 5 : 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 6 : Sites d'interaction de l'actine à la myosine et à la Tm.

Figure 7 : Schématisation de la polymérisation de l'actine.

Figure 8 : A. Assemblage des molécules d'actine (Zone A) et de myosine (Zone M). ELC, chaîne légère essentielle ; RLC, chaîne légère régulatrice. B. Structure hexamérique de la myosine (modifié d'après Libert et Cohen, 1988). C. Sites de liaison de la myosine à l'ATP, à l'actine (Milligan et coll., 1996 pour revue), aux chaînes légères essentielles et régulatrices, à la myoméline (1506-1674) (Obermann et coll., 1997) et à la titine (1813-1825) (Houmeida et coll., 1995). Le rond noir représente une séquence de 29 résidus (1874 à 1902) indispensables à la formation du filament épais (Sohn et coll., 1997).

Figure 9 : Théorie de la contraction musculaire par glissement des filaments et le raccourcissement du sarcomère.

Figure 10 : Le cycle actomyosine. (A) Description du cycle de l'ATP pour la myosine et pour le complexe actine-myosine. La ligne du haut représente l'activité ATPasique de la myosine avec les événements

suivants : liaison de l'ATP, hydrolyse de l'ATP suivie par la libération du phosphate inorganique et ensuite libération de l'ADP. Les étapes équivalentes pour le complexe actine-myosine sont montrées dans la ligne du bas. Les flèches verticales indiquent l'association et la dissociation de l'actine avec la myosine. Les étapes colorées en marron représentent la voie prédominante. M=myosine ; A=actine ; T=ATP ; D=ADP ; Pi=phosphate inorganique. (B) Représentation schématique de la formation des ponts actomyosine. Le cycle débute en absence d'ATP : le complexe actine-myosine (A.M) interagit fortement (état de rigor dit « R ») (state a) ; l'ATP se lie rapidement à la tête de la myosine pour rapidement dissocier ce complexe et le bras levier se met en position pour générer la force (state b) ; l'ATP est ensuite hydrolysée. Dans un premier temps, il y a une faible interaction entre le complexe M.D.Pi et l'actine (state c) puis cette interaction devient forte (state d) ; la liaison à l'actine induit une dissociation du phosphate inorganique (Pi) ce qui déclenche la phase de production du travail (state e) ; le cycle s'achève par la libération de l'ADP (state f) qui fait place à une nouvelle molécule d'ATP pour un nouveau cycle (state a). Les monomères d'actine sont représentés par des sphères. Le domaine moteur est coloré en gris pour la forme libre, en violet foncé quand il est lié faiblement à l'actine et en violet clair quand il est lié fortement à l'actine. Le bras levier est coloré en orange (d'après Geeves et coll., 2005 pour revue).

Figure 11 : Localisation de la tropomyosine et du complexe des troponines sur le filament d'actine.

La tropomyosine s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale d'actine. Les dimères de tropomyosine se chevauchent par recouvrement de leurs extrémités amino et carboxy-terminales. Les flèches indiquent le sens de déplacement de la tropomyosine sur l'actine dans ses positions « off » et « on ». La région amino-terminale de la TnT vient s'ancrer sur la partie carboxy-terminale de la Tm.

La terminaison amino-terminale de la TnC est indiquée en bleu alors que la terminaison carboxy-terminale est en rose. La TnI est indiquée en rouge, la partie inhibitrice en jaune. La TnT est représentée en vert.

La myosine S1 (vert), la chaîne légère essentielle (rouge) et la chaîne légère régulatrice (jaune) sont également représentées. Seules les structures de molécules de TnC, de myosine et de tropomyosine sont représentées. Une simple modélisation correspondant à la TnI et à la TnT est évoquée.

a. Etat de relaxation. La partie amino-terminale de la TnC est liée à du Mg^{2+} . La partie amino-terminale de la TnI est accrochée à la partie carboxy-terminale de la TnC alors que la partie inhibitrice de la protéine interagit avec l'actine et la tropomyosine.

b. Après liaison de 2 molécules de Ca^{2+} sur la partie amino-terminale de la TnC, le domaine inhibiteur de la TnI se désolidarise de l'actine, permettant la formation d'un complexe acto-myosine.

(modifié d'après Gordon et coll., 2000).

Figure 12 : Localisation de la troponine I en vert au sein du filament fin, en absence et présence de calcium.

Les segments 96-115 (contenant la région Ip 104-115) et 140-148 interagissent avec l'actine. La TnI interagit également avec la TnC en rouge et la TnT en bleu.

Un changement conformationnel survient dans le complexe des troponines en présence de calcium.

Le domaine amino-terminal de la TnC s'ouvre (voir figure 9) et expose des résidus hydrophobes qui

vont interagir avec la TnI (116-131) ce qui supprime l'interaction entre le domaine Ip (104-115) de la TnI et l'actine, provoquant une interaction Ip- TnC (d'après Tripet et coll., 1997).

Figure 13 : Interactions TnI-TnC. Représentation schématique des interactions entre TnI et TnC et entre TnI et actine.

A. Le premier modèle présente les sites hachurés de liaison avec le TnC alors que les sites d'interaction avec l'actine sont grisés (d'après Tripet et coll., 1997).

B. Représentation schématique des interactions TnI-TnC-TnT. En présence de calcium (A), la séquence 1-33 interagit avec le domaine carboxy-terminal de la TnC, la séquence 48-89 avec la TnT, la séquence 90-113 avec l'hélice centrale de la TnC, la séquence 114-125 avec le domaine carboxy-terminal de la TnC et la séquence 130-150 avec l'hélice A de la TnC. En absence de calcium (B), la séquence 114-125 s'éloigne de la région amino-terminale entraînant un déplacement des séquences 89-113 et 130-150 de la TnC vers l'actine (Luo et coll., 2000).

Figure 14 : Représentation schématique de la TnT squelettique rapide.

A. La TnT de lapin. Les régions hachurées correspondent aux régions variables entre les isoformes de TnT. Les lignes épaisses indiquent les régions d'interactions de la TnT et des protéines indiquées (d'après Perry, 1998).

B. Rôles fonctionnels des différents domaines de la troponine suivant le modèle proposé par Jin et coll. (2000).

Les domaines d'interactions avec les autres protéines sont indiqués par des traits épais.

Figure 15 : Représentation de la structure cristalline de la TnC. A-H = hélices α . I-IV sites de fixation du Ca^{2+} (EF-Hand).

a. TnC squelettique de dindon avec 2 ions calcium liés sur les sites III et IV, le domaine amino-terminal étant en position fermée.

b. TnC squelettique de lapin. Tous les sites sont occupés. Noter la réorientation des hélices B et C par rapport aux hélices A et D correspondant à une conformation ouverte de la partie amino- terminale.

c. Description des motifs EF-Hand. L'index et le pouce représentent les hélices E et F, le majeur replié la boucle. L'ion Ca^{2+} est piégé au sein d'une structure polyédrique (bipyramide pentagonale). Le fragment de la séquence d'acides aminés de la TnC impliqué dans la coordination du calcium dans les sites I et IV est représenté à gauche du modèle EF-Hand (modifié d'après Da Silva et Reinach, 1991).

Figure 16 : Représentation schématique des interactions existantes entre la TnT (bleue), la TnI (verte), la TnC (rouge) et le filament fin d'actine-tropomyosine. La région amino-terminale de la TnI (1-58) interagit avec le domaine carboxy-terminal de la TnT (16-263) et le domaine carboxy-terminal de la TnC. Le fragment amino-terminal de la TnT interagit avec le filament fin. Ces interactions sont indépendantes du calcium et maintiennent la cohésion de l'ensemble du complexe. Les interactions dépendantes du calcium sont indiquées en noir (d'après Malnic et coll., 1998).

Figure 17 : Représentation schématique de la O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation.

Figure 18 : La O-GlcNAc, une modification post-traductionnelle dynamique et réversible.

Figure 19 : Principe de la Bemad permettant l'identification des sites O-GlcNAc.

Figure 20 : Les domaines structuraux des différents isoformes de l'OGT (d'après Love et Hanover, 2005).

Figure 21 : Domaines structuraux des isoformes de la O-GlcNAcase (d'après Love et Hanover, 2005).

Figure 22 : Schématisation de la voie de biosynthèse des hexosamines. Glc : glucose ; Fru : fructose ; Gln : glutamine ; GlcNH₂ : glucosamine ; GlcNAc : N-acetylglucosamine ; UDP-GlcNAc : Uridine 5'-Diphospho-N-acetylglucosamine ; GFAT : glutamine : fructose 6-phosphate amidotransférase ; OGT : uridine diphospho-N-acetylglucosamine : polypeptide β -N-acetylglucosaminyltransférase ; O-GlcNAcase : N-acetylglucosidase ; PUGNAc : O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino N-phenyl Carbamate (d'après Fülöp et coll., 2007).

Figure 23 : Le O-GlcNAcome (d'après Love et Hanover, 2005).

Figure 24 : Compétition entre la phosphorylation et la O-N-acetylglucosaminylation 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 25 : L'état de modification du CTD de l'ARN polymérase II module son activité transcriptionnelle (d'après Comer et coll., 1999).

Figure 26 : 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., 2005).

Figure 27 : Modèle de la régulation de l'OGT par les AMPK et p38 lors d'une déprivation en glucose (d'après Cheung et Hart, 2008).

Figure 28 : Représentation schématique de l'effet de la phosphorylation de la MLC₂ sur le positionnement des têtes de myosine par rapport au filament fin d'actine. Position des têtes de myosine avant phosphorylation (à gauche) et après phosphorylation de la MLC₂ (à droite) (d'après Sweeney et coll., 1993).

Figure 29 : Anatomie du membre postérieur.

Figure 30 : Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques.

Figure 31 : Exemple de tracé d'un cycle expérimental sur une fibre musculaire isolée.

Figure 32 : Présentation des différents paramètres d'activation calcique des fibres pelées.

Figure 33 : Protocoles expérimentaux.

Figure 34 : Schématisation du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.

Figure 35 : Etapes d'application d'un strip pour l'isoélectrofocalisation dans un sarcophage en céramique.

Figure 36 : Appareil IPGphor permettant de réaliser l'isoélectrofocalisation.

Figure 37 : Spectre MS du peptide synthétique O-GlcNAc après huit heures de BEMAD.

Figure 38 : Résumé des différentes étapes de la MS.

Figure 39 : Résumé des différentes étapes de la LC-MS/MS.

Figure 40 : Enrichissement d'un échantillon de gastrocnemius en protéines contractiles. (1) protéines totales ; (2) protéines contractiles.

Figure 41 : 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 42 : Immunoblot des protéines contractiles avec un anticorps anti-O-GlcNAc (RL-2). (1) dans le soleus (2) dans l'EDL (3) incubation du RL-2 avec 0,5 M de GlcNAc.

Figure 43 : 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 MLC_{2s} ; (B) Spectre de fragmentation obtenu par analyse en chromatographie en phase gazeuse du composé de temps de rétention 32,1 minutes.

Figure 44 : 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 45 : Relation T/pCa des fibres musculaires obtenue après une incubation unique dans une solution de glycérol 0,2 M. $n=7$.

Figure 46 : 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 ($n = 3$).

Figure 47 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

* $p < 0,05$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle.

$p < 0,01$ GlcNAc 0,2M vs Contrôle. $n=11$.

Figure 48 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M. * $p < 0,05$ GalNAc vs Contrôle. $n=5$.

Figure 49 : 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. * $p < 0,05$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle. # $p < 0,01$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle. $n=6$.

Figure 50: Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc à 0, 2M suivie d'un lavage dans une solution R. $n=3$.

Figure 51 : 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 52 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de WGA à 0,1 mg/mL.

* $p < 0,05$ WGA 0,5 mg/mL vs Contrôle.

$p < 0,01$ WGA 0,5 mg/mL vs Contrôle. $n=10$.

Figure 53 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de WGA à 0,5 mg/mL préincubée dans 0,02 M de GlcNAc. $n=10$.

Figure 54 : Electrophorèse monodimensionnelle des protéines contractiles de soleus. Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 10-20 % et révélées au nitrate d'argent (A) ou par western blot en utilisant la WGA peroxydase (B), un anticorps anti-O-GlcNAc (C), ou avec un anticorps anti-O-GlcNAc en présence de 0,5 M de GlcNAc libre (D).

Figure 55 : Stratégie dévouée à l'identification des sites O-GlcNAc sur les protéines contractiles.

Figure 56 : Séquençage d'un peptide DTT après Bemad. A. Profile MS des peptides DTT enrichis après Bemad. B. Fragmentation MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 633.9 avec les ions fragments y et b

permettant l'identification de GY(S-DTT)FVTTAER possédant un DTT sur la sérine 200. C. Profil MS des peptides DTT traités à la β -hexosaminidase puis enrichis après Bemad

Figure 57 : A. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 798.8 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de IEDEQALG(S-DTT)QLQK possédant un DTT sur la sérine 1708. B. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 835.5 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de VVD(S-DTT)LQTSLEAETR possédant un DTT sur la sérine 1097.

Figure 58 : A. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 778.3 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de LAEQELIET(S-DTT)ER possédant un DTT sur la sérine 1920. B. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 584.2 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de EALI(S-DTT)QLTR possédant un DTT sur la sérine 1299.

Figure 59 : Sites de la myosine avec l'ATP, l'actine, la myoméline 1, la protéine M et la titine. Les sites de phosphorylation sont indiqués par une étoile ($\square$). La mutation L17006P responsable de la myopathie distale de Laing est indiquée par une flèche et les sites O-GlcNAc par un losange ($\blacklozenge$).

Figure 60 : Sites de l'actine avec la myosine et la tropomyosine. Les séquences correspondant aux sites O-GlcNAc sont indiquées par un losange ($\blacklozenge$).

Figure 61 : Relation T/pCa des fibres isolées du soleus avant (PRE $\bullet$) et après (POST $\circ$) le bed-rest (pour le groupe BR).

Figure 62 : Effet de 0.2 M de GlcNAc sur les paramètres d'activation calcique des fibres musculaires pelées et isolées de soleus de l'Homme alité pendant deux mois (BR). A, Relation T/pCa de fibres pelées et isolées de **soleus PRE BR** avant ($\bullet$, courbe continue, $n=7$), après une incubation dans 0,2 M de GlcNAc ($\circ$, courbe discontinue, $n=7$) et après un lavage dans une solution R ($\blacktriangledown$, courbe en pointillée, $n=7$). B, Relation T/pCa de fibres pelées et isolées de **soleus POST BR** avant ($\bullet$, courbe continue, $n=5$), après une incubation dans 0,2 M de GlcNAc ($\circ$, courbe discontinue, $n=5$) et après un lavage dans une solution R ($\blacktriangledown$, courbe en pointillée, $n=5$). Les courbes sont lissées selon les paramètres de Hill (n_1 pour $P/P_o > 50\%$ et n_2 pour $P/P_o < 50\%$).

Figure 63 : Variations du taux global de la O-GlcNAc par rapport aux biopsies PRE dans le VL après le bed-rest. $n=4$ pour chaque groupe.

* Différence statistique entre le groupe BR et le groupe BR+EXO ($p<0,05$).

Figure 64 : Variations de l'expression des isoformes de la MLC₂ avant et après le BR sur des biopsies de soleus de sujets des groupes BR (à gauche) et BR+EXO (à droite). * $p<0,05$.

Figure 65 : Séparation par électrophorèse bidimensionnelle et révélation par western blot des variants des isoformes de la MLC_2 (lente « s » et rapide « f »), sur des biopsies de soleus de sujets du groupe BR. A. Séparation avant le bed-rest. B. Séparation après une incubation dans la phosphatase alcaline. Les variants de la MLC_{2s} sont notés s1 et s2 et les variants de la MLC_{2f} sont notés f et f1. C. Séparation après le bed-rest.

Figure 66 : Représentation graphique des changements de la proportion des variants de la MLC_{2s} et de la MLC_{2f} dans le soleus en conditions BR et BR+EXO. Les données, obtenues par densitométrie des immunoblots anti MLC_2 des gels électrophorétiques 2D, représentent le pourcentage de la distribution des variants de la MLC_2 par rapport au total en MLC_{2s} ou en MLC_{2f} .

Figure 67 : Etats de glycosylation des isoformes de la MLC_2 avant et après le BR sur des biopsies de soleus de sujets des groupes BR et BR+EXO. A. Pour l'isoforme lente de la MLC_2 B. Pour l'isoforme rapide de la MLC_2 . C. Analyse de la glycosylation des protéines contractiles par immunoblot à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la O-GlcNAc (RL-2). ** $p < 0,02$.

Abréviations conventionnelles et non conventionnelles

Abréviations	Signification
AD	alzheimer disease
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine 5'-di-phosphate
Akt	RAC(related to the A and C kinases)-alpha serine/threonine-protein
Allo	alloxane
AMP	adénosine 5'-mono-phosphate
AMPC	adénosine 5'-mono-phosphate cyclique
APP	beta-amyloid precursor protein
ARN	acide ribonucléique
ARNi	acide ribonucléique interférentiel
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine 5' -tri-phosphate
Aza	azasérine
BR	bed-rest
BR+exo	bed-rest + exercices
Ca ²⁺	calcium
CaN-NFAT	calcineurin-Nuclear factor of activated T-cells
CB	clenbutérol
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CHIP	carboxyl-terminus of Hsc 70-interacting protein
CHO	chinese hamster ovary
CLFS	Chronic Low Frequency Stimulation
CsA	cyclosporine A
Ct	C-terminal

DE dénervation

DON 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine

DTT di-thiothréitol

E. coli *Escherichia coli*

EDL extensor digitorum longus

EDTA acide éthylène diamine tétraacétique

EGTA acide éthylène glycol bis (β-aminoéthyl ether) N, N, N', N' tétraacétique

E-meg glucosamine-6-phosphate acétyltransférase

eNOS endothelial nitric oxide synthase

Fru-6P (F6P) fructose-6-phosphate

Fru-1, 6bisP (F1, 6bisP) fructose-1, 6-bisphosphate

GalNAc N-acétylgalactosamine

GC gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse)

GFAT glutamine:Fructose 6-phosphate amido-transférase

Glc (G) glucose

GlcNac (GNAc) N-acétylglucosamine

GlcNAcase N-acétyl-β-D glucosaminidase

Glc-1P (G1P) glucose-1-phosphate

Glc-6P (G6P) glucose-6-phosphate

GlcNH₂ (GN) glucosamine

GlcNH₂-6P (GN6P) glucosamine-6-phosphate

GlcNAc-6P (GNAc6P) N-acétylglucosamine-6-phosphate

GlcNAc-1P (GNAc1P) N-acétylglucosamine-1-phosphate

GlcNH₂-6P-Ac Transférase (GN6PAct) glucosamine-6-phosphate acétyltransférase

Gln glutamine

Glu glutamate (acide glutamique)

GLUT glucose transporter

GS glycogène synthase

GSK-3 β glycogène synthase kinase-3 β

HBP hexosamine biosynthetic pathway

HG hypergravité

HH hypodynamie-hypokinésie

HRE Heat Shock Response Element

HU hindlimb unloading

HRP-WGA horse radish peroxidase (WGA couplée à la peroxidase)

Hsc70 70 kDa-Heat shock cognate

HSF Heat Shock Factor

Hsp40 40 kDa-Heat shock protein

Hsp70 70 kDa-Heat shock protein

HSP70 70 kDa-Heat shock proteins family

IEF isoélectrofocalisation

IRS-1/2 insulin receptor substrates-1 and 2

KCl chlorure de potassium

kDa kiloDalton

K_m Constante de Michaelis

K Prop propionate de potassium

MALDI-TOF matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (spectrométrie de masse par désorption/ionization par tir laser assisté par matrice et par mesure du temps de vol)

MAP microtubule associated protein

MAP kinases mitogen activated proteins kinases

Mg²⁺ magnésium

MgAc acetate de magnesium

MHC Myosin Heavy Chain (chaîne lourde de myosine)

MLC Myosin Light Chain (chaîne légère de myosine)

MLCK Myosin Light Chain Kinase

MOPS acide 3-(N morpholino) propane-sulfonique

MP Myosin Phosphatase

MS/MS spectrométrie de masse en tandem

MYPT2 myosin phosphatase target 2

NaCl chlorure de sodium

NCOAT Nuclear Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransférase

NLS nuclear localization signal

Nt N-terminal

O-GlcNAc O-N-acétylglucosaminylation

OGT uridine diphospho-N-acetylglucosamine: polypeptide β -N-acétylglucosaminyltransférase

PDX-1 pancreatic/duodenal homeobox-1 protein

PEST régions riches en résidus de Pro (P), Glu (E), Ser (S) et Thr (T)

PHF paired helical filament

PI3K PI-3(phosphatidylinositol-3) kinase (p85/p110)

PKA protéine kinase A

PKB protéine kinase B (Akt)

PKC protéine kinase C

PNGase F peptide N-glycosidase F

PPi pyrophosphate

PUGNAc O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate

Pyr pyruvate

RE réticulum endoplasmique

RER réticulum endoplasmique rugueux

RL-2 anticorps anti-O-GlcNAc

S. cerevisiae *Saccharomyces cerevisiae*

SDS sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SOL soleus

STZ streptozotocine

TAF TATA-binding-protein associated factor

TAU	tubulin associated unit
TBST	tris buffer saline - Tween 20
Tm	tropomyosine
Tn	troponine
TRP	tetratricopeptide repeat
UDP	uridine diphosphate
UDP-Glc (UG)	uridine diphospho-glucose
UDP-GlcNAc (UGNAc)	uridine diphospho-N-acétylglucosamine
UMP	uridine monophosphate
VL	<i>Vastus Lateralis</i>
WB	Western Blot
WGA	Wheat Germ Agglutinin
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

Chapitre I

Introduction générale

L'analyse des modifications post-traductionnelles est un challenge important dans l'analyse du protéome cellulaire. En effet les modifications post-traductionnelles augmentent considérablement la complexité et la diversité du protéome comme les possibilités de modulation de l'activité des protéines. Parmi les nombreuses modifications post-traductionnelles, il existe deux types de modifications plus couramment étudiées : la phosphorylation et la glycosylation. Les N- et les O-glycosylations se retrouvent sur des protéines membranaires ou sécrétées, et la localisation luminale ou extracellulaire de ces glycanes empêche leur participation dans les voies de régulation des cellules. La O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc) constitue la forme majeure de glycosylation sur les résidus sérine et thréonine des protéines au niveau nucléaire ou cytoplasmique (Torres et Hart, 1984, Hart, 1997 ; Haltiwanger et coll., 1998). C'est une glycosylation originale dans le sens où elle ne fait intervenir qu'un unique monosaccharide, la N-acétyl-glucosamine. C'est une glycosylation dynamique et réversible puisqu'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. La durée de demi-vie de la O-GlcNAc est plus courte que celle du squelette protéique, ce qui indique que la O-GlcNAc pourrait répondre rapidement aux signaux cellulaires. De plus, la O-GlcNAc peut entrer en interaction avec la phosphorylation.

La O-GlcNAc joue un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires tels que le transport cellulaire, la dégradation protéique, la régulation de l'expression des protéines...

Peu de travaux se sont intéressés à l'implication de la O-GlcNAc dans la physiologie musculaire si ce ne sont des travaux décrivant le rôle de la O-GlcNAc dans la résistance à l'insuline (Yki-Jarvinen et coll., 1998). Pourtant, le muscle squelettique est un modèle intéressant en ce qui concerne l'étude de la O-GlcNAc pour trois raisons : (1) son métabolisme est dépendant du glucose, (2) beaucoup de processus cellulaires tels que la contraction musculaire, sont dépendant de la phosphorylation et enfin (3) les fibres musculaires sont capables d'adapter leur phénotype et leur métabolisme (oxydatif ou glycolytique) aux conditions physiologiques, cette plasticité se traduisant par des modifications biochimiques et fonctionnelles. Or, les liaisons O-GlcNAc dépendent également du métabolisme glucidique.

Des travaux du laboratoire ont montré que de multiples protéines du muscle squelettique étaient modifiées par cette glycosylation: des protéines du métabolisme énergétique mais également une protéine clé de la contraction musculaire la chaîne lourde de myosine (Cieniewski-Bernard et coll., 2004). Certaines de ces protéines sont des marqueurs

Introduction générale

de l'atrophie musculaire. L'implication de la *O*-GlcNAc dans la physiologie musculaire est un concept émergent puisque de récents travaux ont montré que cette glycosylation pourrait être impliquée dans les phénomènes de cardioprotection comme dans le métabolisme des protéines musculaires au cours de l'atrophie (Cieniewski-Bernard et coll., 2006 ; Fülöp et coll., 2007).

Notre travail a consisté à approfondir la compréhension du rôle de la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique. Nous avons cherché à identifier si d'autres protéines contractiles que la chaîne lourde de myosine étaient modifiées par cette glycosylation et à définir si la *O*-GlcNAc pouvait jouer un rôle dans la physiologie contractile du muscle squelettique. Nous avons également voulu définir si elle pouvait être impliquée dans le développement de l'atrophie fonctionnelle du muscle lent postural chez l'humain comme cela a été écrit chez le rat (Cieniewski-Bernard et coll., 2006). Dans un premier temps, nous nous intéresserons tout d'abord à la physiologie du muscle squelettique, plus particulièrement aux bases moléculaires de l'activité contractile. Ensuite, nous nous proposons de définir ce qu'est la *O*-N-acétylglucosaminylation et de mettre en évidence son rôle fondamental dans la cellule. Enfin, nous décrirons le rôle de la phosphorylation dans l'activité contractile.

Nos travaux se diviseront en trois parties démontrant l'importance exercée par la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique. Dans un premier temps nous démontrerons que la *O*-GlcNAc concerne de nombreuses protéines contractiles et qu'elle peut être impliquée dans l'activité contractile. Nous décrirons l'analyse des sites modifiés par la *O*-GlcNAc par une approche protéomique. Enfin nous présenterons une analyse de l'implication de la *O*-GlcNAc dans un modèle humain d'atrophie fonctionnelle, le bed-rest, et démontreront une possible interaction entre la phosphorylation et la *O*-GlcNAc pour une protéine clé dans la régulation de la force de contraction, la chaîne légère de myosine régulatrice.

Chapitre

II

Historique du sujet

I - Le muscle squelettique.

I - A. Structure du muscle (figure 1)

Le muscle est un tissu constitué de cellules de grandes tailles, les fibres musculaires.

L'insertion des muscles sur les os se fait le plus souvent par l'intermédiaire de tendons constitués par le prolongement de gaines conjonctives : l'endomysium des fibres, le périmysium des faisceaux de fibres et l'épimysium entourant le muscle. Ces gaines de conjonctif vont assurer un maintien de la structure musculaire au repos et assurer la transmission de la force aux articulations par l'intermédiaire des tendons durant la contraction. Ce tissu confère au muscle une certaine élasticité. Par ailleurs, le muscle est irrigué par un réseau de capillaires qui lui apporte les nutriments et le débarrasse de ses déchets.

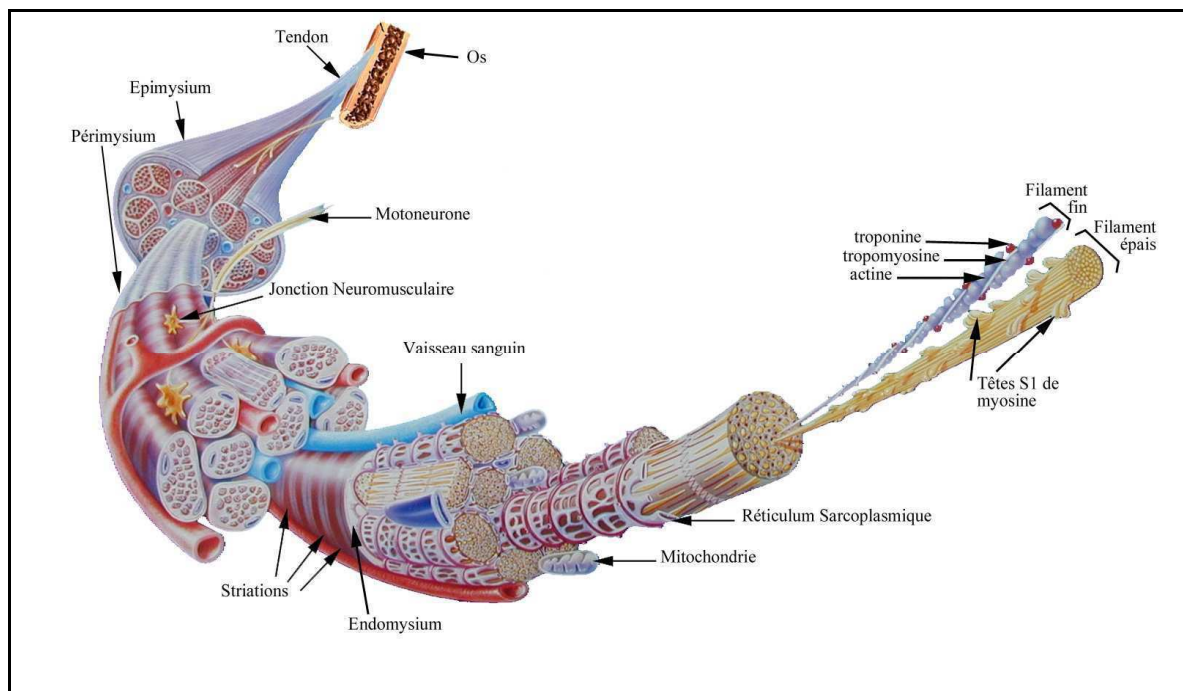


Figure 1 : Du muscle à la biologie moléculaire de la contraction : structure du muscle strié (d'après Kischel, 2000).

Le muscle est un tissu hétérogène constitué par plusieurs types de fibres. On distingue deux types majeurs de fibres : les fibres oxydatives à contraction lente ou fibres de type I et

les fibres glycolytiques à contraction rapide ou fibres de type II (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996).

La distinction des différents types de fibres musculaires est rendue possible grâce à l'utilisation d'une technique histochimique se basant sur l'activité enzymatique de l'adénosine triphosphate (ATPase) des têtes de myosine à différents pH de préincubation (Guth et coll., 1969).

Suivant le type de fibres, l'activité ATPasique varie en fonction du pH. La coloration de chaque type de fibres aux différents pH est représentée dans le tableau suivant :

Tableau I: Coloration des différents types de fibres en fonction de Ph dans le soléaire de rat.

	pH acide 4,3	pH acide 4,45	pH basique 10,4
Type I	Noire 	Noire 	Blanche 
Type IC	Noire 	Noire 	Grise 
Type IIC	Grise 	Noire 	Noire 
Type IIA	Blanche 	Blanche 	Noire 

La préincubation acide permet d'inhiber l'activité ATPasique des fibres de type II mais pas celle des fibres de type I (figure 2). A l'analyse microscopique, les fibres de type I seront donc plus intensément colorées (fibres de coloration noire) que les fibres de type II (coloration grise ou blanche). La fixation au formaldéhyde permet la réversibilité de la réaction. Ainsi, à pH 10,4, les fibres de type II apparaissent colorées en noir alors que les fibres de type I sont blanches (figure 2). Les fibres intermédiaires de type IIC, qui expriment à la fois des isoformes de chaînes lourdes de myosine rapides (MHC IIA) et lentes (MHC I) en égales proportions, peuvent être distinguées par la présence d'une coloration grise à pH 4,3 et d'une coloration noire à pH 4,45 et 10,4. Les fibres intermédiaires de type IIC contenant davantage de MHC I que de MHC IIA présentent une coloration grise à pH 10,4 et une coloration noire à pH 4,3.

Généralités : le muscle squelettique

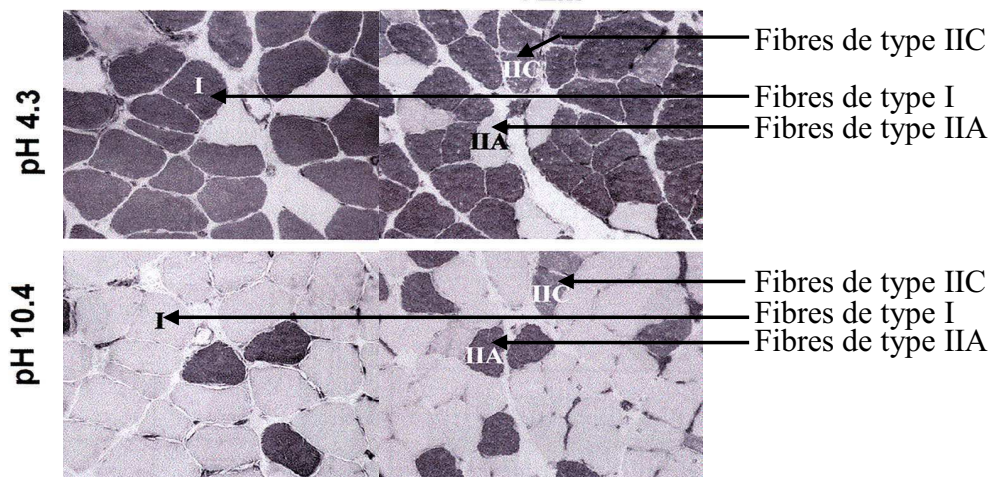


Figure 2 : Photographies des coupes transversales représentatives de la typologie du muscle soleus de rat Contrôles. IIA : fibres rapides de type IIA, IIC : fibres hybrides de type IIC, I : fibres lentes de type I.

Les caractéristiques des différents types de fibres sont récapitulées dans le tableau II.

Tableau II : 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	moyenne	faible
<i>Activité glycolytique</i>	faible	élevée	élevée
<i>Réserve de glycogène</i>	faible	élevée	élevée
<i>Contenance en myoglobine</i>	élevée	élevée	faible
<i>Métabolisme prédominant</i>	oxydatif/ aérobie	mixte	glycolytique/ anaérobie
<i>Réserve en triglycérides</i>	élevée	mixte	faible

Le soleus, un muscle postural lent, est composé de près de 80 % de fibres lentes. Cependant la plupart des muscles sont hétérogènes, le type de fibres dominant étant à l'origine des caractéristiques de ce muscle. Le tableau III présente les proportions relatives d'un type de fibres selon le muscle considéré.

Tableau III : Proportions relatives d'un type de fibres donné selon le muscle considéré (d'après Delp et Duan, 1996 ; Staron et coll., 2005).

	Fibres lentes	Fibres rapides
<i>Soleus</i>	84 %	16 %
<i>Gastrocnemius</i>	24 %	76 %
<i>Extensor digitorum longus</i>	4 %	96 %
<i>Vastus Lateralis</i>	41 %	59 %

I - B. Structure des fibres musculaires (figures 1 et 3)

Les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux de fibres, une fibre musculaire étant une cellule plurinucléée pouvant mesurer plusieurs centimètres.

Une fibre musculaire présente une striation caractéristique due à la présence de myofibrilles strictement arrangées entre elles. Ces myofibrilles sont constituées de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine et sont entourées d'un réseau membranaire, le réticulum sarcoplasmique qui est un stock de calcium intracellulaire. Ce réticulum est accolé à un réseau membranaire dérivé du sarcolemme qui correspond à des invaginations profondes de la membrane plasmique formant le système tubule transverse (STT).

Ces tubules transverses présentent des zones de contact avec le réticulum sarcoplasmique et plus particulièrement les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique pour former une triade. Cette structure va jouer un rôle fondamental dans le couplage excitation-contraction de la cellule musculaire.

Le sarcoplasme de la fibre musculaire contient d'autres organites, comme de nombreuses mitochondries dont l'apport énergétique sera fondamental au bon fonctionnement musculaire, en particulier pour les muscles lents.

Chaque fibre est sous le contrôle d'un seul neurone moteur (innervation monosynaptique). Un même motoneurone peut innerver plusieurs fibres : on parle d'unité motrice.

I - C. Structure des myofibrilles (figures 3 et 4)

Le muscle squelettique et les fibres musculaires présentent une double striation, horizontale correspondant aux myofilaments et verticale provenant de l'organisation des protéines contractiles en sarcomères, unité anatomo-fonctionnelle de la myofibrille. Un sarcomère est délimité par deux bandes dites bandes Z et se compose principalement de deux types de filaments, l'actine et la myosine (figure 3). Le chevauchement des filaments d'actine et de myosine correspond à une bande sombre ou bande A (anisotrope) par opposition à la bande claire (I pour isotrope) constituée uniquement de filaments fins (figure 3). Au cours de la contraction, la longueur du sarcomère va varier suite à une diminution de la bande claire, la bande A restant à une longueur constante. La contraction va donc résulter du glissement des filaments fins et épais, entrelacés qui va entraîner un phénomène actif (raccourcissement) et passif (la relaxation) (figure 4).

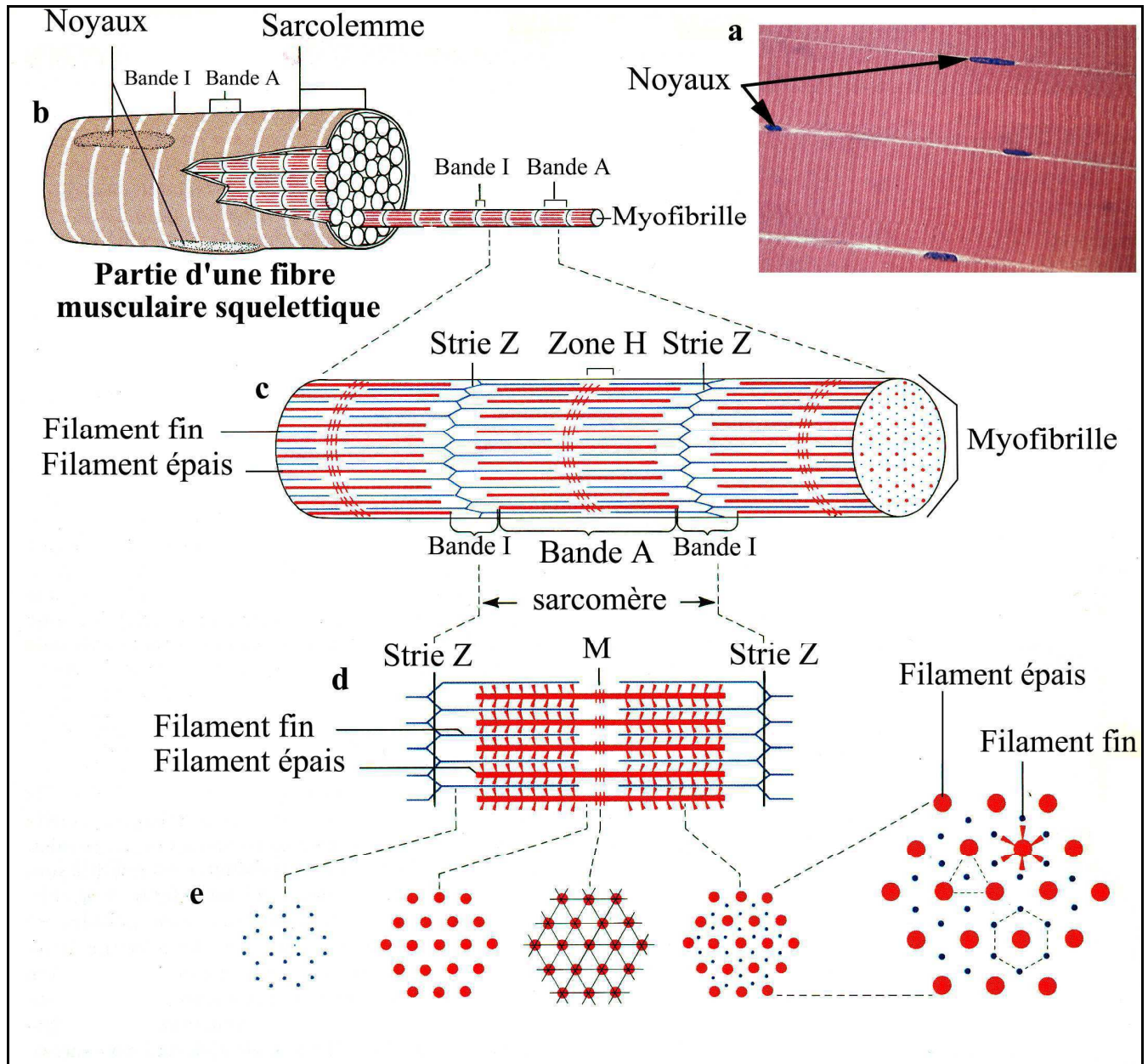


Figure 3 : Organisation d'une fibre musculaire striée.

a - Photomicrographie d'une portion de deux fibres musculaires (x 250).

b - Schéma d'une portion de fibre comportant de nombreuses myofibrilles.

c - Schéma d'une portion de myofibrille montrant la succession de sarcomères.

d - Schéma de la disposition des filaments fins et épais au sein d'un sarcomère.

e - Coupes transversales réalisées à différents endroits d'un sarcomère.

(d'après Kischel, 2000).

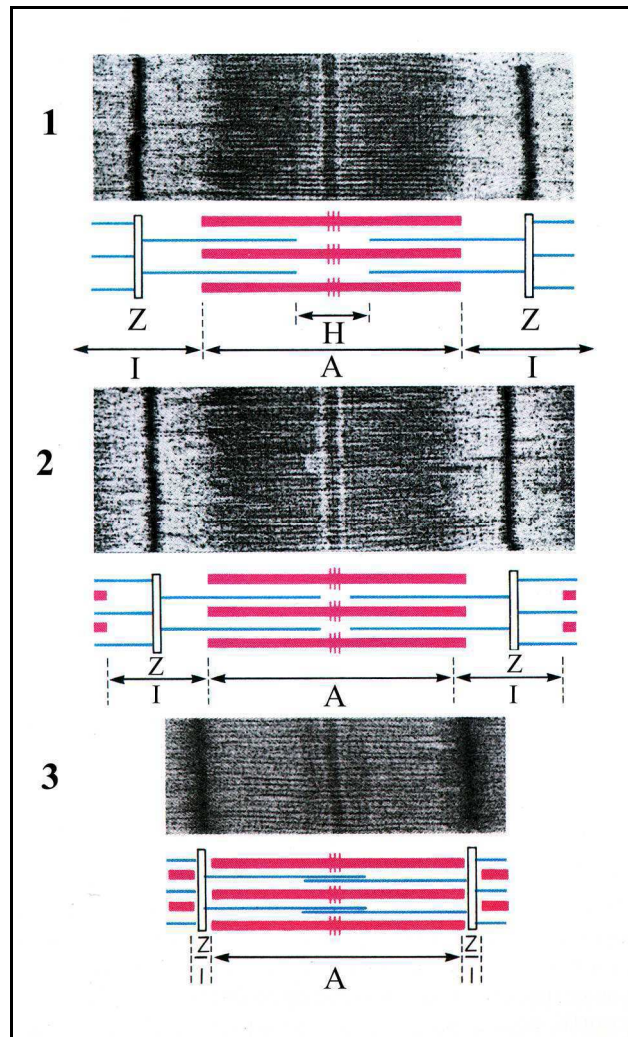


Figure 4 : Photomicrographie d'un sarcomère (x 20 000) : au repos (1), en contraction partielle (2), en contraction complète (3).

Les stries Z délimitent le sarcomère. Bande A, anisotrope dont la longueur ne varie pas au cours de la contraction. Bande I, isotrope dont la longueur varie en fonction du degré de contraction (d'après Marieb, 1993).

I - D. Les protéines contractiles motrices (figures 5 et 6)

1. L'actine

C'est la protéine prépondérante des cellules Eucaryotes : elle représente 20 % des protéines dans la cellule musculaire et 1 à 5 % des protéines dans les autres cellules.

L'actine est la protéine majeure du cytosquelette, elle existe sous deux configurations :

- Monomérique (ou globulaire) : l'actine G.
- Polymérisée sous forme de filaments : l'actine F.

a) L'actine monomérique (Fattoum A, 2001)

i) Structure (figures 5 et 6)

Il s'agit d'une protéine globulaire de 42 kDa, appelée actine G, constituée d'une chaîne polypeptidique unique de 375 acides aminés. Elle apparaît comme l'une des protéines les mieux conservées au cours de la phylogenèse. Il existe différentes isoformes d'actine codées par des gènes structurellement très proches qui auraient évolué à partir d'un gène ancestral commun. Leurs séquences primaires sont similaires à plus de 90 % (Hightower et Meagher, 1986). Chez les vertébrés supérieurs, on distingue six isoformes qui diffèrent uniquement par quelques acides aminés et s'expriment d'une façon indépendante à l'espèce, mais spécifique au tissu cellulaire et au stade de développement. On distingue :

- L'isoforme spécifique du muscle squelettique, de type α ;
- L'isoforme présente dans le muscle cardiaque, également de type α ;
- Les isoformes trouvées dans le muscle lisse, de type α et γ ;
- Et enfin, deux actines cytosquelettiques de type β et γ .

Les appellations α , β et γ ont été données en fonction de la séparation en électrofocalisation des différentes isoformes.

L'actine monomérique comporte un petit et un grand domaine, divisés chacun en deux sous-domaines (Holmes et coll., 1990 et Mannherz, 1992) (figures 5 et 6). Le premier renferme le sous-domaine 1 (résidus 1-32, 70-144 et 338-375) et le sous-domaine 2 (résidus 33-69) tandis que le second est constitué du sous-domaine 3 (résidus 145-180 et 270-337) et du sous-domaine 4 (résidus 181-269) (figure 6). Le sous-domaine 1 contient les deux extrémités amino- et carboxy-terminales, et les principaux sites d'interaction avec les protéines de liaison qui seront décrites ultérieurement. Entre les deux sous-domaines 2 et 4, il y a une « crevasse » qui est le lieu de fixation du nucléotide (ATP ou ADP) et du cation (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), indispensable à la stabilité de la molécule. Quand il est dans la crevasse, l'ATP agit comme un verrou qui arrime les deux domaines l'un à l'autre ; par conséquent, la présence d'ATP ou d'ADP va moduler la conformation de la molécule d'actine. La présence d'une telle crevasse confère à la molécule une certaine flexibilité.

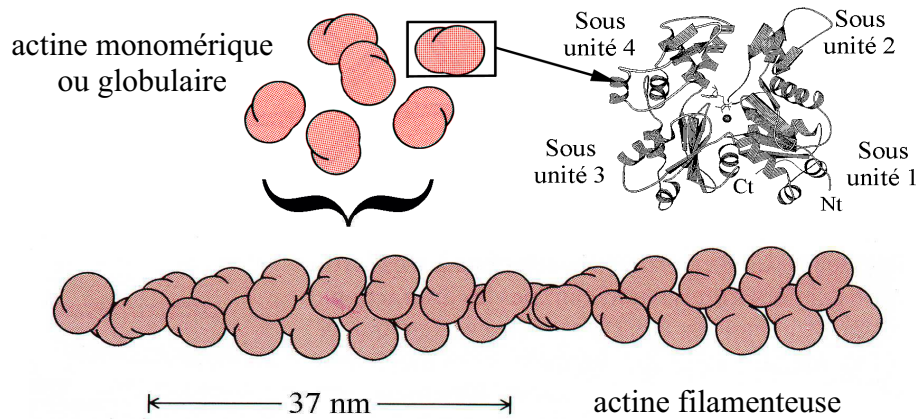


Figure 5 : Arrangement des globules d'actine dans le filament d'actine ; L'assemblage des globules d'actine forme une structure hélicoïdale (d'après Alberts et coll., 1993). L'agrandissement montre la structure d'un globule d'actine constitué de quatre sous-unités.

ii) Fonctions de l'actine monomérique (figure 6)

L'actine a deux rôles : elle sert d'une part de charpente dans l'architecture cellulaire et d'autre part, elle joue un rôle dans la motilité cellulaire, en interagissant avec la myosine, les troponines et la tropomyosine (protéines ayant un rôle clé dans la stabilisation et la régulation de la contraction musculaire). Se pose alors un problème majeur, celui de déterminer les interactions spécifiques entre l'actine et ces autres protéines. Dans le paragraphe suivant, nous allons récapituler un certain nombre de données concernant ces sites d'interactions. Nous nous contenterons dans un souci de clarté, de présenter les interactions de l'actine avec les protéines pouvant servir de support à la discussion des résultats (myosine et tropomyosine).

Rayment et coll., montrent que les résidus 1-4, 24, 25, 99 et 100 du sous-domaine 1 de l'actine interagissent avec les résidus 626-647 de la myosine (Rayment et coll., 1993a). Une autre séquence du sous-domaine 3 (144-146) lie aussi la myosine (Rayment et coll., 1993a). De plus, les charges négatives du sous-domaine 2, portées par les alanines 56 et 57, sont très importantes pour la liaison de la myosine à l'actine, les interactions tropomyosine-actine et les changements conformationnels du complexe actine-troponines-tropomyosine (Korman et coll., 2000). Il a été en effet montré qu'une mutation de ces acides aminés par de l'aspartate et du glutamate entraînait une diminution de l'affinité de la tête S1 de la myosine pour l'actine et une diminution de l'activité ATPasique de l'acto-myosine. L'affinité de la tropomyosine pour l'actine était quant à elle, augmentée. Enfin, les mêmes auteurs ont également précisé qu'en présence de calcium, la tropomyosine bougeait dans la gorge de l'actine pour libérer les sites d'interaction à la myosine mais ne libérait pas tous les sites, ce qui entraînait une inhibition de l'activation du filament fin. Un autre résidu dans le sous-domaine 2 joue un rôle très

important dans la position de la tropomyosine dans la gorge formée par les filaments d'actine. Il s'agit de la lysine 93. Il a été démontré que le remplacement de cette charge négative par une charge positive (avec le glutamate par exemple), dans 60 % des cas, en présence de Ca^{2+} , inhibait le changement conformationnel de la tropomyosine et donc masquait toujours les sites d'interaction à la myosine (Cammarato et coll., 2005). Au niveau du sous-domaine 3, l'actine lie la myosine au niveau des résidus 332-333 et 341-354 (Rayment et coll., 1993a).

L'association entre l'actine et la tropomyosine est dynamique et est en grande partie de nature électrostatique. Les zones d'interaction de l'actine avec la tropomyosine sont localisées principalement dans les sous-domaines 3 et 4. Dans le sous-domaine 4, on distingue ainsi quatre zones d'interaction de l'actine à la tropomyosine : les séquences 203 à 216 ; 223 à 230 ; 238 à 241 et 253 à 260 (Lorenz et coll., 1995). Dans le sous-domaine 3, les zones de contact de l'actine à la tropomyosine sont : l'hélice 288 à 294 et le fragment allant de l'isoleucine 309 à la lysine 336 (Lorenz et coll., 1995). Les sites d'interaction de l'actine à la myosine et à la tropomyosine sont représentés dans la figure 6.

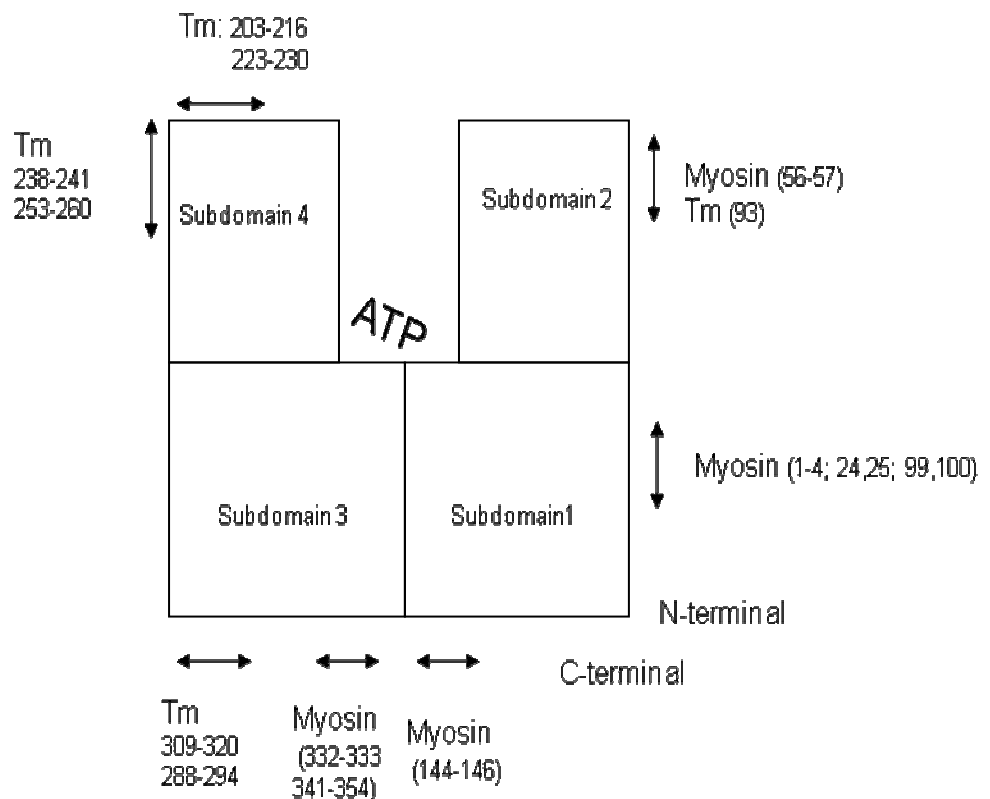


Figure 6 : Sites d'interaction de l'actine à la myosine et à la tropomyosine.

b) Le polymère d'actine (figure 7)

La polymérisation est une propriété intrinsèque de l'actine qui, dans la même cellule et au même moment peut exister sous deux formes interconvertibles, en équilibre dynamique, une forme monomérique globulaire, ou actine-G déjà décrite, et une forme polymérique filamenteuse ou actine-F (Fattoum A, 2001 ; Janmey et coll., 2001).

Ce sont des forces électrostatiques et hydrophobes qui contribuent à la formation de ces polymères. L'actine F est une structure flexible et polaire, d'apparence filamenteuse avec une extrémité barbée (+) dite à croissance rapide et une extrémité pointue (-) dite à croissance lente. La structure du filament d'apparence hélicoïdale (type double brin) est de 8 nm de diamètre et de quelques microns de long (Milligan et coll., 1990). Cette hélice présente un enroulement dextre, comprenant 13 monomères pour 6 tours d'hélice (Egelman, 1985). Tous les monomères d'un même filament ont la même orientation (Sheterline et Sparrow, 1994).

L'actine-G se polymérise en présence d'ATP. Cette polymérisation se déroule en quatre étapes fondamentales (Craig et coll., 1980) plus ou moins lentes, sensibles à la force ionique, au Ca^{2+} et au Mg^{2+} , à la nature du ligand nucléotidique (ATP ou ADP) et à la concentration (0,1 à 1 μM) dite critique et notée C_c de l'actine-G (figure 7).

- Etape 1 : Activation du monomère :

La présence de sel, d'ATP et d'une concentration protéique minimale (C_c) entraîne des changements dans la conformation du monomère d'actine, qui entre dans un état activé et acquiert des propriétés structurales différentes, lui conférant notamment une plus grande résistance à la protéolyse. Cette nouvelle entité protéique possède désormais les compétences nécessaires pour le déclenchement du processus de polymérisation.

- Etape 2 : Nucléation du monomère :

Relativement lente, la phase de nucléation est essentielle et dépend beaucoup de la concentration en actine. C'est une étape limitante d'initiation de la polymérisation qui correspond à la formation de noyaux constitués de 2, 3 ou 4 monomères d'actine G-ATP.

- Etape 3 : Allongement du filament.
- Etape 4 : Équilibre.

C'est l'étape la plus rapide caractérisée par l'association de monomères d'actine aux deux extrémités du centre de nucléation ou du filament en cours de formation. La vitesse de

croissance du polymère est 5 à 10 fois plus rapide à l'extrémité barbée qu'à l'extrémité pointue.

La polymérisation de l'actine est suivie de l'hydrolyse différée de l'ATP en ADP + Pi. Le phosphate (Pi) libéré, déstabilise les interactions actine-actine, entraînant une dissociation des molécules d'actine liées à l'ADP. Cette dissociation est plus rapide à l'extrémité pointue du filament qu'à son extrémité barbée. Les molécules d'actine ainsi libérées doivent être rechargées en ATP avant de rejoindre à nouveau le filament. La force thermodynamique de l'hydrolyse de l'ATP engendre une sorte de manège moléculaire continu ou « tapis roulant » (treadmilling). Ce phénomène a lieu *in vitro* et *in vivo* et assure la stabilité et la relative constance des longueurs des filaments d'actine à l'état d'équilibre. Il est à la base de la motilité cellulaire. Les filaments s'allongent à l'une des deux extrémités et raccourcissent simultanément à l'autre. Le niveau d'équilibre est atteint lorsque la vitesse de croissance du polymère est nulle. Au terme de leur formation, les filaments continuent à échanger lentement les sous-unités de leurs extrémités avec les monomères libres dont la concentration doit être égale à C_c . La figure 7 récapitule les différentes étapes de polymérisation de l'actine. Il a été démontré que la séquence allant des résidus 373 à 375 est indispensable à l'interaction entre les monomères d'actine. En effet, si cette région est retirée, la dissociation des monomères d'actine à la fin des polymères augmente (Mossakowka et coll., 1993).

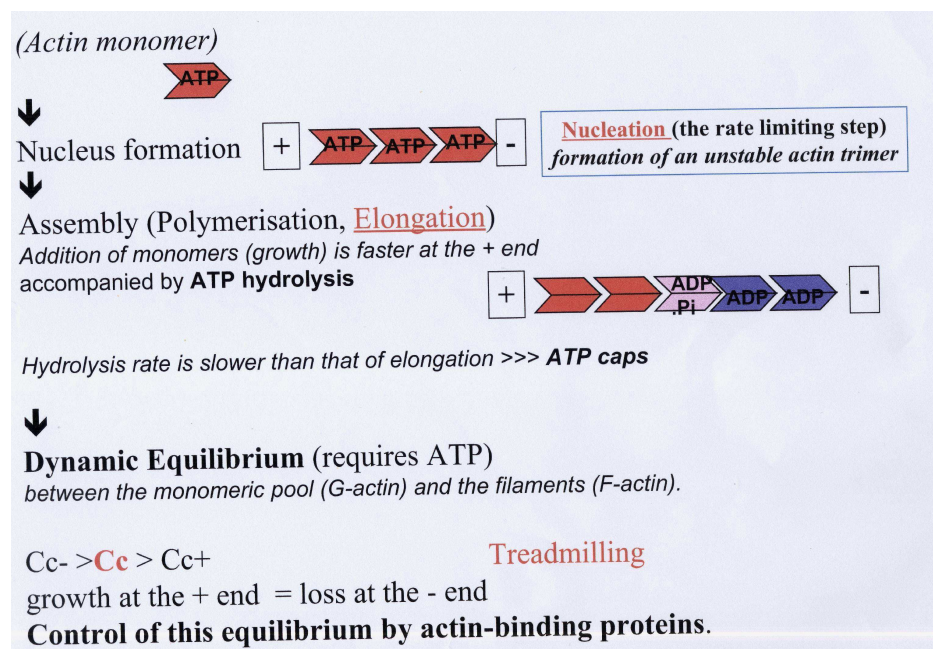


Figure 7 : Schématisation de la polymérisation de l'actine.

In vivo, la polymérisation de l'actine est contrôlée par de nombreuses protéines, comme la profiline, le complexe ARP 2/3, la CapZ, la tropomoduline et la gelsoline.

La profiline (15 kDa) se fixe à l'actine monomérique liant alors l'ATP et aidant à la réintégration de l'actine dans le polymère (Pollard et Cooper, 1984).

Le complexe ARP 2/3 (Actin related Proteins 2 and 3, de 42 et 47 kDa respectivement) est impliqué dans l'initiation de la polymérisation. Le complexe se fixe du côté (-) du filament et sa présence favorise la formation d'une amorce constituée de trois monomères liés entre eux (site de nucléation). Les pôles (+) et (-) du filament peuvent être protégés par les protéines de coiffage (capping). Ces protéines empêchent l'actine, dans son état ADP, de quitter le polymère mais empêchent aussi la polymérisation dans son état ATP. La protéine CapZ, constituée d'un dimère de deux sous-unités (alpha, 34 kDa et Béta, 30 kDa), se fixe au pôle (+), évitant la croissance rapide (Casella et coll., 1987).

La tropomoduline (40 kDa) se fixe au pôle (-), évitant ainsi la croissance lente (Weber et coll., 1994). CapZ et la tropomoduline assurent donc la stabilisation des polymères d'actine- α dans les muscles striés.

Enfin, la gelsoline (82 kDa), en présence d'une concentration élevée de Ca^{2+} cytosolique, se fixe au polymère d'actine et crée une coupure engendrant la dislocation du filament d'actine (McGough et Way, 1995). La gelsoline reste fixée à l'extrémité (+), évitant ainsi la repolymérisation rapide.

2. La myosine

a) Structure (figure 8)

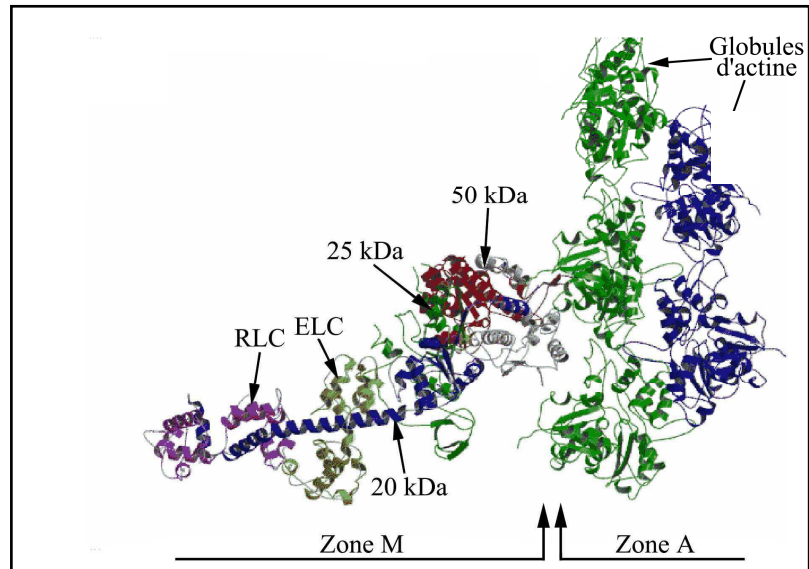
La myosine est une protéine hexamérique en forme de club de golf. Elle est constituée de deux chaînes lourdes de myosine (MHC, Myosin Heavy Chains) de 200 kDa environ, auxquelles sont associées deux paires de chaînes légères de myosine (MLC, Myosin Light Chains), d'un poids moléculaire de 18-22 kDa (Warrick et Spudich, 1987). 300 molécules de myosines forment un filament épais de 15 nm de diamètre et de 1,5 μm de longueur (Huxley, 1975).

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

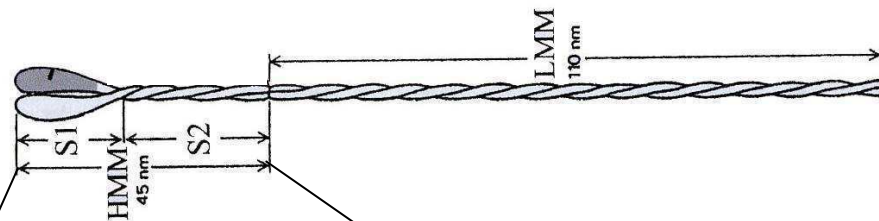
clivée en une tête S1 globulaire et une portion fibrillaire S2. La tête S1 de la myosine porte le site de fixation de l'ATP et le site d'interaction à l'actine. Elle présente une structure secondaire complexe centrée autour d'une combinaison de sept feuillets β et correspond à l'association de trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa.

La figure 8 illustre la structure de la myosine (a et b) avec ses différents sites d'interaction avec l'ATP, l'actine, les chaînes légères essentielles et régulatrices, la myoméline, la protéine M et la titine (c).

A.



B.



C.

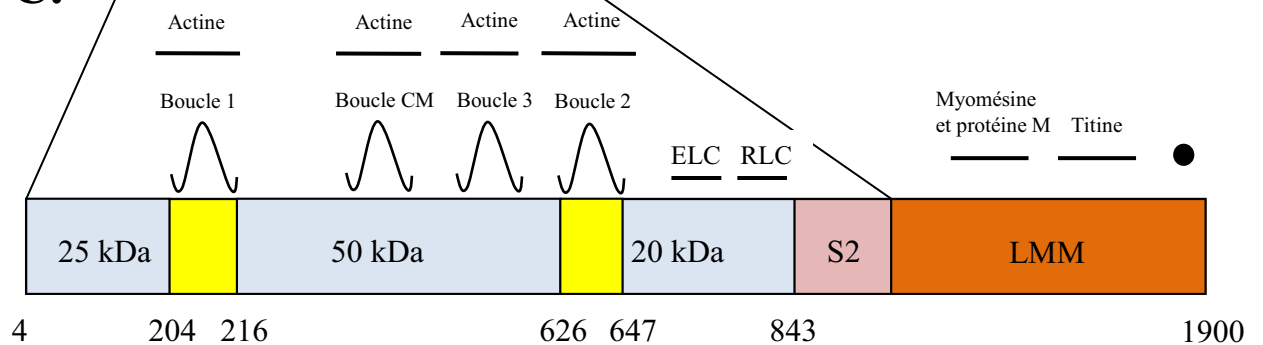


Figure 8 : A. Assemblage des molécules d'actine (Zone A) et de myosine (Zone M). ELC, chaîne légère essentielle ; RLC, chaîne légère régulatrice. B. Structure hexamérique de la myosine (modifié d'après Libert et Cohen, 1988). C. Sites de liaison de la myosine à l'ATP, à l'actine (Milligan et coll., 1996), aux chaînes légères essentielles et régulatrices, à la myoméline (1506-1674) (Obermann et coll., 1997), à la protéine M et à la titine (1813-1825) (Houmeida et coll., 1995). Le rond noir représente une séquence de 29 résidus (1874 à 1902) indispensable à la formation du filament épais (Sohn et coll., 1997).

Les segments amino-terminal, central et carboxy-terminal s'étendent des résidus aspartate 4-glutamate 204, glycine 216-tyrosine 626, et glutamate 647-lysine 843 (Lecarpentier, 1998). Le fragment de 25 kDa lie le nucléotide (ATP ou ADP) (Szilagyi et coll., 1979). Les fragments de 50 et 20 kDa fixent l'actine. Une fente étroite sépare la région de 50 kDa en deux domaines, supérieur et inférieur, et s'étend sous la poche de fixation du nucléotide vers l'extrémité de la molécule. Cette fente étroite permet une communication entre le site de fixation de l'actine et le site de fixation de l'ATP. Ces trois segments sont séparés par des boucles dont nous allons voir l'importance. La boucle 1 ou boucle P allant des résidus 204 à 216 est située dans la poche de fixation à l'ATP (Lecarpentier, 1998). La boucle 2 (résidus 626 à 647) qui fait la jonction entre les fragments de 50 et 20 kDa, représente le principal site de liaison à l'actine (Milligan et coll., 1996). Une troisième boucle allant du résidu 567 à l'acide aminé 578 (Milligan et coll., 1996) interagit aussi avec l'actine. Enfin, un autre contact de type hydrophobe est formé par l'interaction des résidus 332-334 de l'actine avec la boucle dite CM (cardiomyopathie) allant des résidus 403 à 415 du S1. Une mutation de l'arginine 403 (Geeves et coll., 2005) de cette boucle de la myosine β -cardiaque humaine est associée à une cardiomyopathie hypertrophique familiale (Geisterfer-Lowrance et coll., 1990). Cette région contient également le site de phosphorylation régulant l'activité de certaines myosines non conventionnelles (Myosines des classes I et VI). Une phosphorylation de ce site augmente fortement la stimulation de l'activité ATPasique de l'acto-myosine (Brzeska et coll., 1989 ; Buss et coll., 1998). La partie carboxy-terminale du sous-fragment S1 forme une longue chaîne en hélice α qui joue le rôle de bras de levier. La longueur du bras de levier détermine l'amplitude du mouvement effectué par la tête de la myosine au cours de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La chaîne légère essentielle (ELC) et la chaîne légère régulatrice (RLC) sont accolées à cette hélice α (Rayment et coll., 1993a ; Rayment et coll., 1993b ; Xie et coll., 1994). La chaîne légère essentielle interagit avec la chaîne lourde de myosine au niveau des résidus 783 à 806 et la chaîne légère régulatrice interagit avec la chaîne lourde de myosine au niveau des résidus 808 à 842 (Rayment et coll., 1993a). Les deux chaînes légères augmentent la rigidité du bras de levier (Lecarpentier, 1998). Outre leur rôle de stabilisation et de rigidification de l'hélice α , les chaînes légères servent « d'amplificateur » au mouvement induit par les changements conformationnels liés à la fixation et à la libération du nucléotide (Lecarpentier, 1998).

Il existe deux types de chaînes légères, les essentielles (Alkali light chains ou DNTB-LC, car clivée par l'acide dithiobis-2-nitrobenzoïque) qui correspondent aux MLC₁ et MLC₃ et les régulatrices correspondant aux MLC₂.

La MLC₂

Les MLC₂ sont également appelées MLC phosphorylables (Gordon et coll., 2000). Cette modification post-traductionnelle a un rôle modulateur de la contraction puisqu'elle permet d'augmenter la force de contraction à de faibles concentrations en ions calcium (Persecchini et coll., 1985 ; Sweeney et coll., 1993).

i. Structure de la MLC₂

La MLC₂ a été largement étudiée à un niveau génétique dans les années 70. La séquence de son gène a été décodée dans de nombreuses espèces. Sa structure chez les mammifères reste encore controversée. Chez le rat, cette séquence comporte 7 exons et 6 introns (Nudel et coll., 1984).

La traduction de l'ARNm codant la MLC₂ donne naissance chez le rat, à une protéine de 17 kDa (Schiaffino et Reggiani, 1996). Deux isoformes de MLC₂ sont décrites dans le muscle squelettique : la MLC_{2-f} (MLC2 fast) et la MLC_{2-s} (MLC2 slow). Il faut noter l'existence de la MLC_{2-m}, exprimée au niveau des muscles mandibulaires. Les MLC₂ sont localisées au niveau de la jonction tête-queue des MHC et stabilisent l'hélice α située au niveau de la partie charnière de la molécule de MHC (Szczena, 2003). Les MLC₂ sont liées de façon non-covalente aux chaînes lourdes de myosine de sorte que leur domaine N-terminal s'enroule autour du domaine C-terminal des MHC entre les résidus 825 et 842, alors que leur domaine C-terminal interagit avec les MHC entre les résidus 808 et 826 (Rayment et coll., 1993a, figure 8a).

La partie N-terminale de la MLC₂ contient un site de liaison pour les cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}), localisé dans le premier motif hélice-boucle-hélice. Ce site a une conformation équivalente à celui de la TnC, protéine régulatrice que l'on va décrire ultérieurement. En absence de calcium, ce site est dans une conformation dite « fermée » due au repliement des hélices les unes sur les autres. Le calcium entraîne l'établissement d'une « conformation ouverte » consécutive au déplacement des hélices qui deviennent perpendiculaires. Il est pour l'instant supposé que ce site de fixation $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ influencerait sur

la liaison des MLC_2 aux MHC, entraînant alors des effets sur le cycle des ponts actine-myosine (Szczesna, 2003).

ii. Fonctions de la MLC_2

La première fonction de la MLC_2 qui a été décrite est un rôle dans la stabilité des sarcomères. La localisation de la MLC_2 au niveau du « coude » de la MHC suppose une implication possible de celle-ci dans le système du cycle des ponts actine-myosine. Il a été en effet démontré que le domaine de liaison des MLC_2 aux MHC subissait 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 ; Uyeda et coll., 1996 ; Szczesna, 2003). Dans le muscle squelettique, en utilisant des protocoles d'extraction-remplacement des MLC sur fibres pelées, Szczesna et coll., (1996a) ont démontré que l'absence de MLC_2 dans le complexe moléculaire contractile induisait une diminution de moitié du niveau de redéveloppement de la tension musculaire obtenue pour des concentrations calciques sous-maximales. De même, il a été observé que les filaments d'actine présentaient, lors d'expériences d'« in vitro motility assay », une vitesse de déplacement sur les têtes de myosine réduite après extraction des MLC_2 (Lowey et coll., 1969). Cette vitesse redevient « normale » après réincorporation des MLC_2 .

La MLC_2 module également la force générée par la fibre musculaire en fonction de la concentration calcique (Perrie et coll., 1973). Cette régulation met en jeu une modification de la phosphorylation de la protéine qui régule l'interaction actine-myosine. La phosphorylation de la MLC_2 permet d'augmenter la tension développée à de faibles concentrations de calcium (Persechini et coll., 1985 ; Sweeney et coll., 1993). Cette phosphorylation est elle-même contrôlée par un déplacement de l'équilibre kinase/phosphatase (équilibre relatif à l'activité enzymatique mais aussi à l'expression de la protéine), enzymes liées à l'état de phosphorylation/déphosphorylation de la MLC_2 .

b) Famille multigénique

Les MHC et les MLC comportent plusieurs isoformes codées par une famille multigénique : ainsi, dix isoformes de myosine ont été décrites. Dans les fibres squelettiques de mammifères adultes, quatre isoformes sont exprimées de façon prédominante (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996) :

- la MHC de type I caractéristiques des fibres lentes,
- les MHC de type II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIx, IIy caractéristiques des fibres rapides.

Il existe également un polymorphisme des chaînes légères de myosine. Les fibres musculaires rapides contiennent deux isoformes de chaînes légères essentielles, la MLC_{1f} (MLC1 fast) et la MLC_{3f} (MLC3 fast), tandis que les fibres lentes présentent une isoforme de chaînes légères essentielles : la MLC_{1s} (MLC1 slow). Il existe également l'isoforme MLC_{1-emb} (MLC1 embryonnaire), exprimée au niveau des muscles en développement. Toutes ces isoformes dérivent de gènes distincts excepté la MLC_{1f} et la MLC_{3f}, 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 MLC_{1f} (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.

Deux isoformes de chaînes légères régulatrices sont décrites dans le muscle squelettique : la MLC_{2f} (MLC2 fast) au niveau des fibres rapides, et la MLC_{2s} (MLC2 slow) au niveau des fibres lentes. Il faut noter l'existence de la MLC_{2m} (MLC₂ mandibulaire) au niveau des muscles mandibulaires.

Les isomyosines correspondent à la combinaison des différentes isoformes de MHC et des chaînes légères.

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 IV).

Tableau IV : Isoformes des protéines myofibrillaires MHC 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
ELC	MLC _{1-f} MLC _{3-f}	MLC _{1-s}
RLC	MLC _{2-f}	MLC _{2-s}

c) Les protéines associées à la myosine

Les MBP ou Myosin Binding Proteins sont à prendre en compte dans la formation du filament épais. Il s'agit de la protéine H (MBP-H), la protéine M, la myomesine et la protéine C.

La protéine H fut découverte chez le lapin (Yamamoto, 1984). C'est une protéine de 58,5 kDa dont aucune isoforme n'a été rapportée dans la littérature. La protéine C est une protéine de 130 kDa retrouvée dans la bande A et formée de dix motifs globulaires. Les protéines H et C participent au bon déroulement de la polymérisation de la myosine.

Un autre partenaire de la myosine est la titine. Elle interagit avec la myosine au niveau des résidus 1813 à 1825 (Houmeida et coll., 1995). La titine correspond au troisième réseau de filaments après l'actine et la myosine. Cette protéine de 3,5 mDa (Maruyama et coll., 1977) s'étend du disque Z (extrémité NH₂) à la partie M (extrémité COOH). Sa séquence est constituée à 90 % de répétition Immunoglobulines (Ig) et de fibronectines de type III (Labeit et Kolmerer, 1995). Cette protéine constitue une matrice organisatrice et une plate forme pour différents systèmes moléculaires. De plus, elle comprend un domaine kinase qui participerait à la signalisation moléculaire (Gautel et Goulding, 1996).

La myomesine est une protéine de 185 kDa qui interagit avec la titine et la myosine connectant probablement les filaments épais au troisième réseau de filaments (Grove et coll., 1985 ; Auerbach et coll., 1999).

L'autre protéine interagissant avec la myosine est la protéine M. La myoméline et la protéine M interagissent avec la myosine sur les résidus 1506 à 1674 (Obermann et coll., 1998).

3. Principe général du mécanisme de la contraction musculaire – Le cycle ATPasique de la myosine (figure 9-10)

a) Théorie de la contraction par glissement des filaments (figure 9)

Lorsqu'une cellule musculaire se contracte, chacun de ses sarcomères raccourcit, et les stries Z successives se rapprochent les unes des autres. 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.

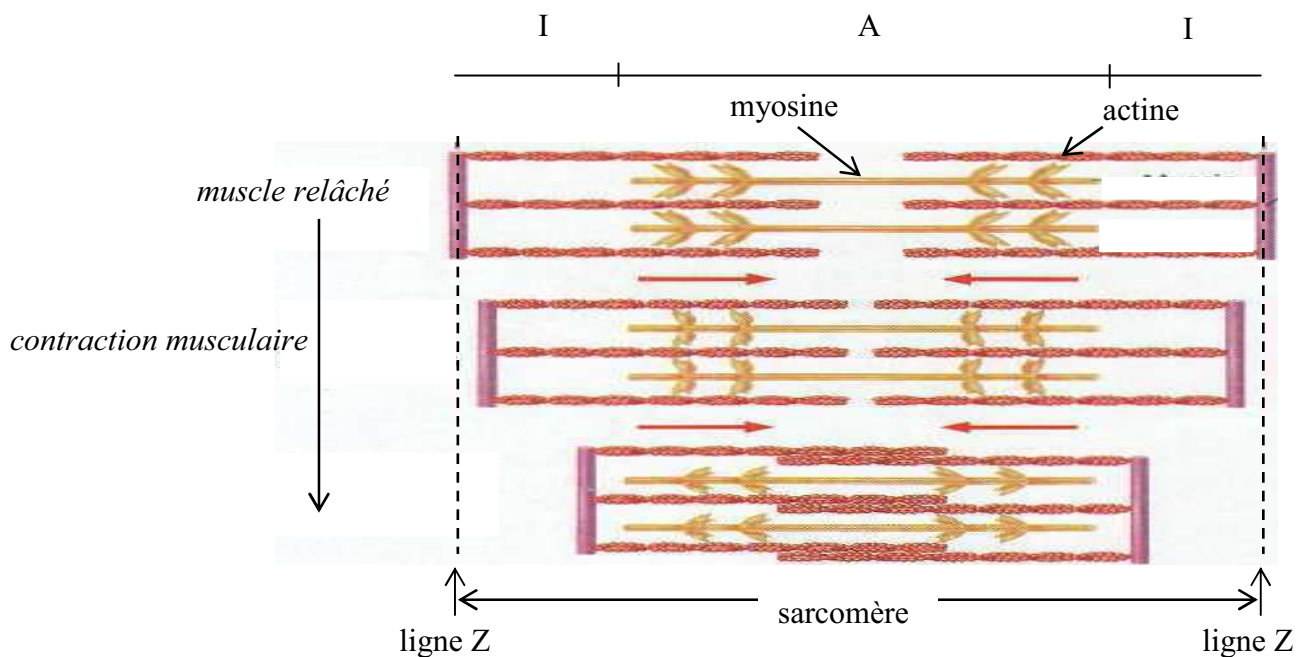


Figure 9 : Théorie de la contraction musculaire par glissement des filaments et le raccourcissement du sarcomère.

Dans une fibre musculaire au repos, les filaments épais et fins se chevauchent seulement sur une partie de leur longueur. Au cours de la contraction, les filaments fins pénètrent de plus en plus loin dans la région centrale de la bande A. Ceci aboutit à un raccourcissement de la distance entre les deux stries Z successives. Les stries I sont également raccourcies, les zones claires disparaissent et les bandes A se rapprochent les unes des autres (figure 9). Mais en aucun cas, la longueur des filaments diminue.

La théorie des filaments glissants et le modèle des ponts actine-myosine (Huxley et coll., 1969) (Swinging crossbridge) que nous allons décrire maintenant, ont largement contribué à la connaissance des mécanismes contractiles à l'échelle cellulaire et moléculaire.

b) Le cycle ATPasique de la contraction (figure 10) : le modèle des ponts actomyosine : le « swinging crossbridge » (Geeves et coll., 2005)

Le fonctionnement du moteur moléculaire repose sur des faits maintenant bien établis. L'hydrolyse de l'ATP survient lorsque la myosine est dissociée de l'actine ou du moins est faiblement attachée à l'actine (Lymn et coll., 1971). La phase de génération de la force (power stroke) et de raccourcissement du pont (step size) succède immédiatement à la libération du phosphate inorganique (Pi). Le modèle du cycle de l'interaction actine-myosine proposé par Rayment (Rayment et coll., 1993b) est décrit ci-dessous. Le cycle (figure 10), par convention, débute en l'absence d'ATP, la myosine étant encore fixée de façon étroite à l'actine (étape a). Dans cette conformation, la fente étroite séparant les domaines supérieurs et inférieurs de la région de 50 kDa est fermée. La première étape du cycle consiste en une baisse de l'affinité de la myosine pour l'actine lorsque l'ATP se fixe à la tête de la myosine. L'attachement du phosphate- γ de l'ATP dans la poche de la tête de la myosine provoque l'ouverture de la fente étroite. Cela diminue l'affinité de l'actine vis-à-vis de la myosine, entraînant la séparation des deux molécules (étape b). Le site sur lequel se fixe le phosphate γ est localisé près de la frontière séparant les domaines supérieur et inférieur de la région de 50 kDa. Le processus d'attachement de l'ATP comporte plusieurs étapes. Dans la première, les phosphates α , β et γ et peut-être une partie du ribose du nucléotide, s'attachent au sous-fragment S1 au niveau de la boucle P située à la base de la poche de fixation du nucléotide, n'induisant pas de changement conformationnel majeur. Un changement conformationnel important survient ensuite lorsque la poche de fixation du nucléotide se ferme autour de sa base. Ceci entraîne une modification de la courbure de la tête de la myosine. L'étape suivante

est l'hydrolyse de l'ATP (étape c), survenant lorsque la poche est en conformation refermée. La tête de la myosine subit alors une rotation provoquée par les phénomènes de diffusion.

L'attachement de la myosine à l'actine est lui aussi un processus comportant plusieurs étapes (figure 10). Dans un premier temps, une interaction faible entre l'actine et la myosine (étape c) ferait participer une boucle flexible (boucle 2) située à la jonction des segments 50 kDa et 20 kDa. Cette interaction non stéréospécifique, servirait à maintenir la myosine proche de l'actine après l'étape de l'hydrolyse de l'ATP. Dans un second temps, survient une interaction forte actine-myosine qui est extrêmement stéréospécifique (étape d). La tête de la myosine est attachée au filament épais par l'intermédiaire d'une double hélice à structure superenroulée, ce qui lui confère un faible degré de liberté vis-à-vis de sa fixation à l'actine. Cet attachement établit un contact étroit entre l'actine et le domaine inférieur du fragment de 50 kDa et entraîne un changement conformationnel de la tête de la myosine avec la fermeture de la fente étroite.

L'interaction forte de la tête de la myosine avec l'actine provoque la libération du phosphate inorganique (étape e), à la suite de la fermeture de la fente étroite. La libération du phosphate γ déclenche la phase de production du travail et inverse le changement conformationnel induit par la fixation de l'adénine du nucléotide. Il s'ensuit une réouverture de la poche de fixation de l'ATP. L'ADP est alors libéré (étape f) de sorte qu'une nouvelle molécule d'ATP puisse rapidement se fixer et faire ainsi débuter un nouveau cycle (étape a). Il existe certains arguments expérimentaux en faveur de changements conformationnels du sous-fragment 1 durant le cycle. On a observé des modifications de distance entre les cystéines 697 et 707 lorsque le nucléotide s'accroche à la poche de fixation (Wells et coll., 1979). Ce domaine est proche de la chaîne légère essentielle, de sorte qu'un mouvement à ce niveau peut lui être transmis et, par la suite, à la partie de la longue chaîne α de la myosine sur laquelle est fixée la chaîne légère régulatrice. Si le changement conformationnel associé à la fermeture de la poche est transmis aux chaînes légères par l'intermédiaire de la zone de contact avec la chaîne légère essentielle, la fermeture de la poche peut alors permettre à la longue hélice α de subir une rotation notable par rapport au site de fixation de l'actine. Les différentes étapes du cycle des ponts acto-myosine sont schématisées sur la figure 10.

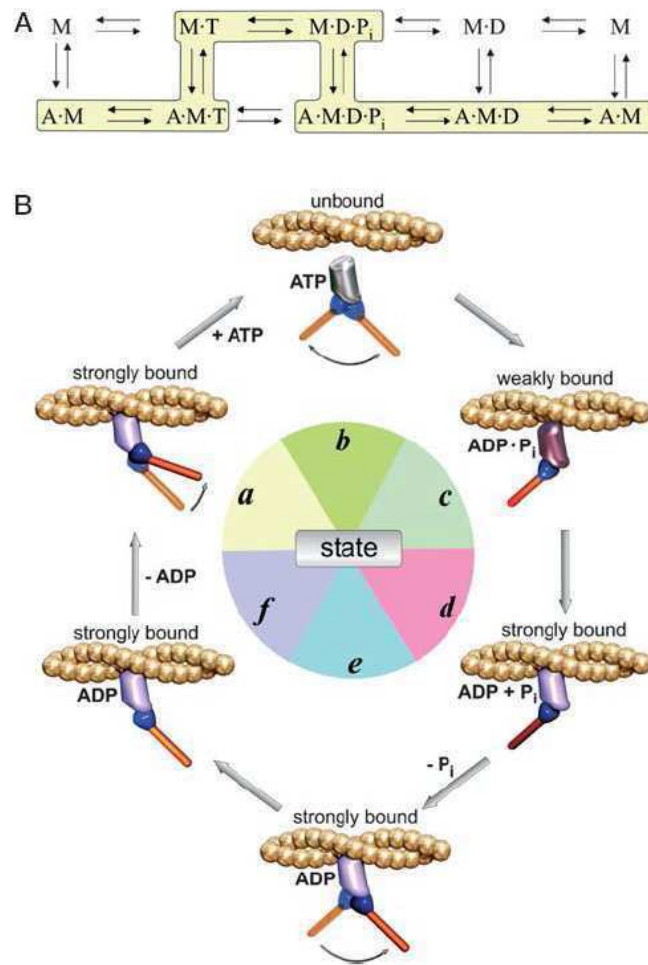


Figure 10 : Le cycle actomyosine. (A) Description du cycle de l'ATP pour la myosine et pour le complexe actine-myosine. La ligne du haut représente l'activité ATPasique de la myosine avec les événements suivants : liaison de l'ATP, hydrolyse de l'ATP suivie par la libération du phosphate inorganique et ensuite libération de l'ADP. Les étapes équivalentes pour le complexe actine-myosine sont montrées dans la ligne du bas. Les flèches verticales indiquent l'association et la dissociation de l'actine avec la myosine. Les étapes colorées en marron représentent la voie prédominante. M=myosine ; A=actine ; T=ATP ; D=ADP ; P_i=phosphate inorganique. (B) Représentation schématique de la formation des ponts actomyosine. Le cycle débute en absence d'ATP : le complexe actine-myosine (A.M) interagit fortement (état de rigor dit « R ») (state a) ; l'ATP se lie rapidement à la tête de la myosine pour rapidement dissocier ce complexe et le bras levier se met en position pour générer la force (state b) ; l'ATP est ensuite hydrolysée. Dans un premier temps, il y a une faible interaction entre le complexe M.D.P_i et l'actine (state c) puis cette interaction devient forte (state d) ; la liaison à l'actine induit une dissociation du phosphate inorganique (P_i) ce qui déclenche la phase de production du travail (state e) ; le cycle s'achève par la libération de l'ADP (state f) qui fait place à une nouvelle molécule d'ATP pour un nouveau cycle (state a). Les monomères d'actine sont représentés par des sphères. Le domaine moteur est coloré en gris pour la forme libre, en violet foncé quand il est lié faiblement à l'actine et en violet clair quand il est lié fortement à l'actine. Le bras levier est coloré en orange (d'après Geeves et coll., 2005).

c) 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. Cependant de nombreuses protéines et interactions protéiques jouent un rôle fondamental dans la régulation calcique de la contraction et dans le couplage excitation-contraction ou ECC. Ces protéines existent souvent sous la forme d'isoformes multiples aux propriétés spécifiques, que l'on peut distinguer et identifier à l'aide de techniques électrophorétiques.

Ces principales protéines clés, polymorphiques, du muscle squelettique qui sont impliquées dans le ECC comprennent : la sous-unité α du récepteur aux dihydropyridines (DHPR), le récepteur à la ryanodine ou canal calcique du réticulum sarcoplasmique (RyR), les protéines régulatrices de la contraction musculaire ou troponine (Tn) qui correspond à trois sous unités, la TnC, la TnI, la TnT, la tropomyosine (Tm), les chaînes lourdes (MHC) ainsi que les chaînes légères de myosine (MLC), la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA), et la calsequestrine qui lie le Ca^{2+} dans la lumière du réticulum sarcoplasmique (RS).

La liste des isoformes de ces protéines du muscle squelettique a augmenté au fil de ces dernières années grâce au développement de techniques de plus en plus fines de séparation et d'identification des protéines.

Cette diversité d'isoformes diffère énormément entre les différentes protéines : ainsi dix isoformes de MHC sont dénombrées alors que seulement deux isoformes de TnC sont actuellement décrites, l'une, TnCf (f pour fast) étant caractéristique et prédominante dans le muscle rapide, l'autre TnCs (s pour slow) dans le muscle lent.

La variabilité et le polymorphisme protéiques sont à la base de la diversité du muscle squelettique, de la spécialisation des fibres musculaires à leur fonction physiologique et de leur plasticité à la demande physiologique dans des conditions normales ou pathologiques.

1) Les protéines régulatrices (figures 11 - 16)

a) La tropomyosine (figure 11)

i) Structure

La tropomyosine (Tm) est un dimère de protéines de 35 kDa (Woods, 1967) formant une torsade. Plusieurs dimères s'assemblent par liaison à leurs extrémités carboxy- et

amino-terminales avec chevauchement de 8-9 acides aminés, et forment ainsi le long filament de tropomyosine (Flicker et coll., 1982). La structure cristalline du domaine carboxyterminal de la tropomyosine montre que cette région (263-284) ne forme pas une double hélice comme le reste de la molécule : les deux hélices sont séparées et stabilisées par l'association avec une autre molécule de tropomyosine (Li et coll., 2002). Chaque dimère comporte sept séquences répétitives qui correspondent à des sites d'interaction avec les monomères d'actine (Cummins et Perry, 1973) ce qui stabilise le filament d'actine (Lees-Miller et Helfman, 1991). Les parties intermédiaires sont importantes pour l'activation de l'actine par la myosine (Hitchcock-De Gregori et coll., 2002). La partie carboxy-terminale est un site d'accrochage du complexe de la troponine T (Hammel et Hitchcock-De Gregori, 1996), qui est donc l'interaction permettant la liaison de la troponine au filament fin (Hinkle et coll., 1999). Dans le muscle strié, la TnT chevauche et consolide la liaison entre deux tropomyosines (Maytum et coll., 1999 ; Li et coll., 2002).

ii) Polymorphisme

Les tropomyosines sont codées par quatre gènes : Tm α , Tm β , Tmp3, Tmp4. Ces gènes peuvent générer une multitude d'isoformes, spécifiques des tissus et des stades de développement. Dans le muscle squelettique, on distingue trois isoformes de sous-unité de tropomyosine : α , β et Tmp3. α et β présentent près de 86 % d'homologies de séquence. Cependant leur expression est caractéristique d'un type de muscle, ce qui semble indiquer qu'elles ont des propriétés fonctionnelles spécifiques (Muthuchamy et coll., 1995). Ainsi, l'isoforme α est plus spécifiquement exprimée dans les fibres rapides tandis que l'isoforme β est plus spécifique aux fibres lentes (Muthuchamy et coll., 1997).

La Tmp3 (Pieples et Wieczorek, 2000) présente de nombreuses homologies avec la Tm α du muscle lent de poulet. Cette isoforme ne serait réellement exprimée que dans le muscle soléaire et est absente des autres muscles striés (Pieples et Wieczorek, 2000). Ainsi le dimère de tropomyosine se présentera (sauf pour le soleus) sous une forme homomérique (α , α) ou hétéromérique (α , β).

iii) Etat « on » et « off » de la Tm (figure 11)

Une corrélation entre la vitesse de contraction et l'isoforme de Tm a été suggérée par de nombreux travaux (Bronson et Schachat, 1982 ; Schachat et coll., 1987 ; Schachat et coll., 1995).

La tropomyosine peut adopter trois états sur l'actine, « bloqué » (« blocked » state) quand il n'y a pas de calcium, « fermé » (« closed » state ou position « off ») ou « ouvert » (« open » state ou position « on ») en présence de calcium. Ces différentes positions de la Tm déterminent l'état d'activation du filament fin (Lehman et coll., 1994). Lorsque la Tm est en position « bloquée » : elle couvre tous les sites de liaison de l'actine à la myosine, empêchant ainsi toute interaction acto-myosine (Gomes et coll., 2002). En position « off », la Tm qui se trouve au bord du sillon de l'actine permet l'interaction faible de l'actine et de la myosine en dévoilant une grande partie des sites d'interaction de l'actine à la myosine (état a sur la figure 11) (Gomes et coll., 2002) mais empêche l'isomérisation $A \rightarrow R$ (Geeves et Halsall, 1987). En position « on » (b de la figure 11), la Tm est éloignée de 30° de sa position « off » (Vibert et coll., 1997 ; Xu et coll., 1999) et libère tous les sites de liaison de l'actine à la myosine permettant ainsi l'interaction forte actine-myosine (Gomes et coll., 2002).

L'isomérisation $A \rightarrow R$ et le passage « off » $\rightarrow$ « on » sont couplés puisque les têtes S_1 de myosine ne peuvent pas s'isomériser tant que le filament n'est pas dans un état « on ».

Les différentes isoformes de Tm peuvent affecter la performance du sarcomère, en diminuant la sensibilité calcique et en modulant l'activation calcique en relation avec sa longueur (Pieples et coll., 2002).

Le positionnement de la Tm est régulé par le complexe des troponines (Tn), présent tous les 7 monomères d'actine et composé de trois sous-unités protéiques, la troponine C, la troponine T et la troponine I.

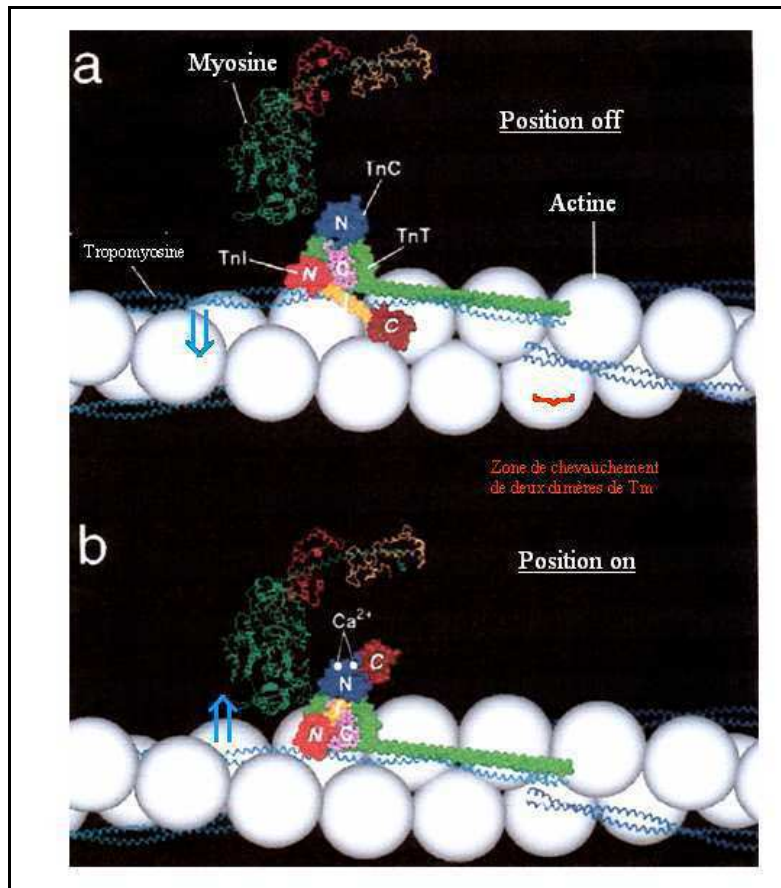


Figure 11 : Localisation de la tropomyosine et du complexe des troponines sur le filament d'actine.

La tropomyosine s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale d'actine. Les dimères de tropomyosine se chevauchent par recouvrement de leurs extrémités amino et carboxy-terminales. Les flèches indiquent le sens de déplacement de la tropomyosine sur l'actine dans ses positions « off » et « on ». La région amino-terminale de la TnT vient s'ancrer sur la partie carboxy-terminale de la Tm.

La terminaison amino-terminale de la TnC est indiquée en bleu alors que la terminaison carboxy-terminale est en rose. La TnI est indiquée en rouge, la partie inhibitrice en jaune. La TnT est représentée en vert.

La myosine S1 (vert), la chaîne légère essentielle (rouge) et la chaîne légère régulatrice (jaune) sont également représentées. Seules les structures de molécules de TnC, de myosine et de tropomyosine sont représentées. Une simple modélisation correspondant à la TnI et à la TnT est évoquée.

a. Etat de relaxation. La partie amino-terminale de la TnC est liée à du Mg^{2+} . La partie amino-terminale de la TnI est accrochée à la partie carboxy-terminale de la TnC alors que la partie inhibitrice de la protéine interagit avec l'actine et la tropomyosine.

b. Après liaison de 2 molécules de Ca^{2+} sur la partie amino-terminale de la TnC, le domaine inhibiteur de la TnI se désolidarise de l'actine, permettant la formation d'un complexe acto-myosine.

(modifié d'après Gordon et coll., 2000).

b) La troponine I (figures 12 et 13)

La troponine I (I pour inhibitrice de la contraction) est liée à l'actine et maintient le complexe (Tn – Tm) dans la position « off ».

i) Structure

La TnI est une protéine globulaire de 21 kDa (Perry, 1999) qui possède des interactions permanentes avec la TnC (Sheng et coll., 1992) et la TnT (Chong et Hodges, 1982).

ii) Polymorphisme

Trois types de TnI ont été décrits : lent, rapide et cardiaque (Hartner et Pette, 1990). Ces trois isoformes présentent une forte homologie dans le domaine carboxy-terminal, alors que le domaine amino-terminal présente une plus grande variabilité. L'isoforme cardiaque présente une extension amino-terminale phosphorylable par la protéine kinase A en réponse à une stimulation adrénergique du cœur (De Tombe et Solaro, 2000). Cette phosphorylation diminue la sensibilité calcique et augmente le niveau de relaxation de la force (Zhang et coll., 1995 ; Kentish et coll., 2001).

iii) Fonctions (figure 12 et 13)

L'activité ATPasique du complexe acto-myosine est inhibée par la TnI (Greaser et Gergely, 1973). Cette activité inhibitrice est potentialisée par la Tm (Perry et coll., 1972). Le fragment 96-115 contient la séquence fondamentale nécessaire à cette inhibition (Talbot et Hodges, 1981), le fragment 104-115 ou Ip pour « inhibitory peptide » (figure 12). L'Ip possède en effet une activité inhibitrice et se lie à l'actine de façon Ca^{2+} dépendante (Syska et coll., 1976 ; Talbot et Hodges, 1981).

La séquence 135-181 est également impliquée dans l'interaction actine – Tm (Takeda et coll., 1997).

La séquence 96-148 présente une activité inhibitrice similaire à la TnI intacte (Tripet et coll., 1997) (figure 12). De plus, la séquence 140-148 correspondrait à un site de liaison au complexe actine-Tm. En l'absence de Ca^{2+} , la TnI exercerait donc un effet inhibiteur grâce aux séquences 140-148 et 104-115 par accrochage au filament d'actine bloquant le complexe Tm-Tn en état « off » (figure 12).

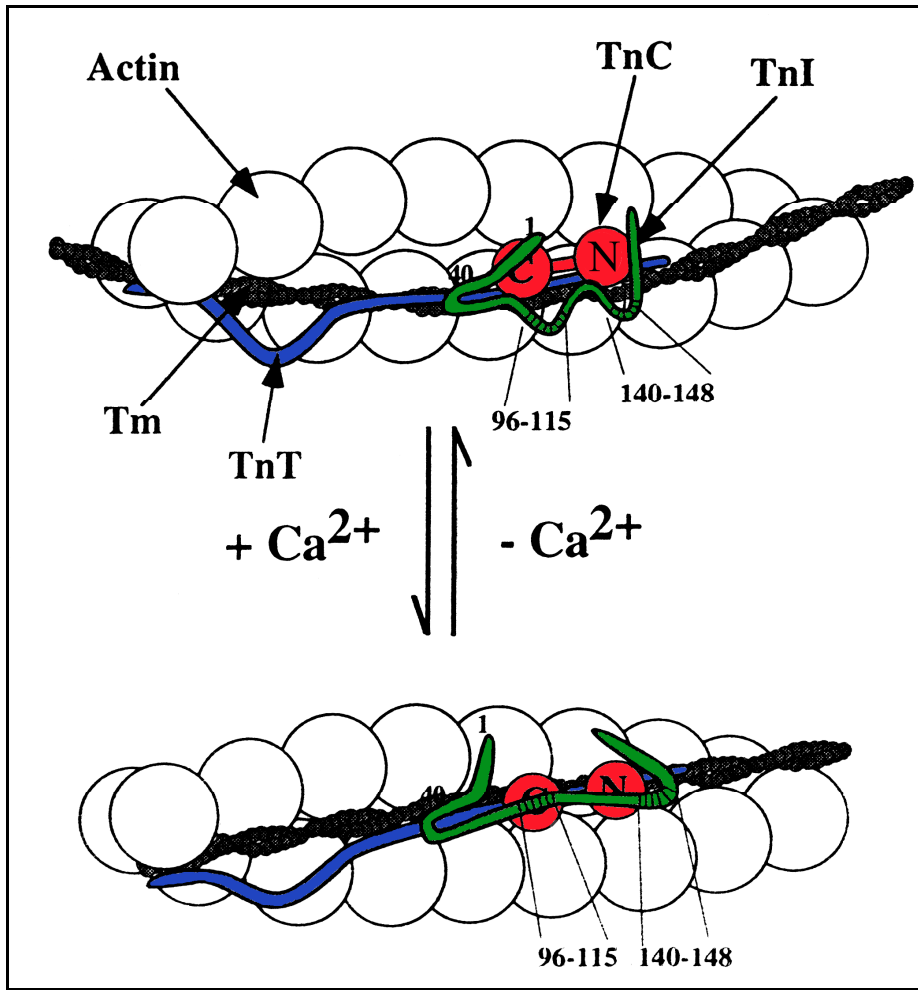


Figure 12 : Localisation de la troponine I en vert au sein du filament fin, en absence et présence de calcium.

Les segments 96-115 (contenant la région Ip 104-115) et 140-148 interagissent avec l'actine. La TnI interagit également avec la TnC en rouge et la TnT en bleu.

Un changement conformationnel survient dans le complexe des troponines en présence de calcium. Le domaine amino-terminal de la TnC s'ouvre (figure 11) et expose des résidus hydrophobes qui vont interagir avec la TnI (116-131) ce qui supprime l'interaction entre le domaine Ip (104-115) de la TnI et l'actine, provoquant une interaction Ip- TnC (d'après Tripet et coll., 1997).

La région amino-terminale possède également des fonctions importantes. La séquence 1-40 (peptide Rp) peut se lier à la TnC en absence de Ca^{2+} et est responsable de l'accrochage de la TnC dans la structure ternaïre (Sheng et coll., 1992 ; Farah et coll., 1994 ; Potter et coll., 1995). La partie amino-terminale de la TnI interagit avec la partie carboxy-terminale de la TnC et inversement pour la terminaison carboxy-terminale de la TnI (Farah et coll., 1994 ; Ngai et coll., 2001). La formation d'un complexe TnI-TnC

modifie les interactions TnI-filament fin, de sorte que la TnI se dissocie de l'actine (Tao et coll., 1990).

La partie carboxy-terminale de la TnI pourrait jouer un rôle dans la régulation de la contraction du muscle strié suivant une interaction dépendante du calcium avec le domaine régulateur de la TnC (Digel et coll., 2001).

L'utilisation de mutants a permis de préciser les interactions existantes entre TnI, TnC et TnT (figure 13A et 13B). Le model proposé (Luo et coll., 2000 ; Li et coll., 2001) décrit qu'en présence de calcium, la séquence 1-33 de la TnI interagit avec le domaine carboxy-terminal de la TnC, alors que la séquence 48-89 interagit avec la TnT, la séquence 90-113 avec l'hélice centrale de la TnC et la séquence 114-125 avec le domaine amino-terminal de la TnC. En absence de calcium, la séquence 114-125 s'éloigne de la terminaison amino-terminale de la TnC et entraîne le déplacement des séquences 89-113 et 130-150 de la TnC vers l'actine.

En 2008, Galińska-Rakoczy et coll., montrent que le domaine C-terminal de la TnI se lie au filament d'actine, en formant des extensions qui relient les monomères adjacents d'actine sur un site normalement occupé par la Tm lorsque la concentration en calcium est élevée. Cette interaction de la TnI avec l'actine au niveau du sous-domaine 3 (309-330) déloge la tropomyosine de sa position « fermée », et la contraint à adopter la position « bloquée ». Lorsque le calcium sature la TnC, celle-ci se lie à la TnI, ce qui libère la Tm de sa position « bloquée » et permet l'interaction actine-myosine (Galińska et coll., 2008).

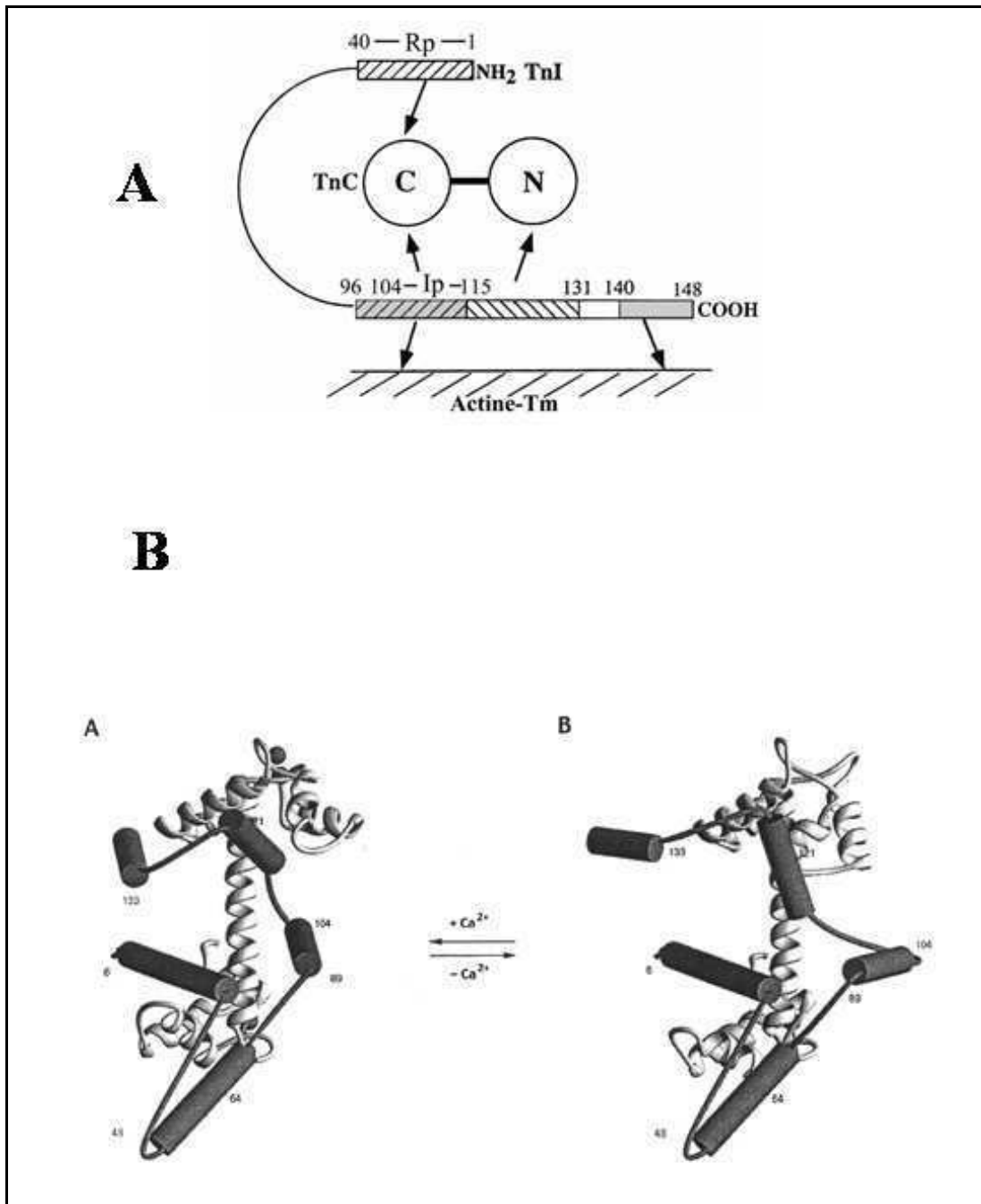


Figure 13 : Interactions TnI-TnC. Représentation schématique des interactions entre TnI et TnC et entre TnI et actine.

A. Le premier modèle présente les sites hachurés de liaison avec le TnC alors que les sites d'interaction avec l'actine sont grisés (d'après Tripet et coll., 1997).

B. Représentation schématique des interactions TnI-TnC-TnT. En présence de calcium (A), la séquence 1-33 interagit avec le domaine carboxy-terminal de la TnC, la séquence 48-89 avec la TnT, la séquence 90-113 avec l'hélice centrale de la TnC, la séquence 114-125 avec le domaine carboxy-terminal de la TnC et la séquence 130-150 avec l'hélice A de la TnC. En absence de calcium (B), la séquence 114-125 s'éloigne de la région amino-terminale entraînant un déplacement des séquences 89-113 et 130-150 de la TnC vers l'actine (Luo et coll., 2000).

c) La troponine T (figure 14)

i) Structure

La troponine T est la troponine qui lie la tropomyosine aux autres sous-unités du complexe des troponines et joue donc un rôle central dans la régulation du filament fin par le calcium. C'est une protéine asymétrique de 31-36 kDa qui comporte une tête globulaire carboxy-terminale et une partie allongée amino-terminale.

Trois gènes codant respectivement pour la TnT cardiaque (Cooper et Ordahl, 1984), l'isoforme lente (Gahlman et coll., 1987) et rapide (Breitbart et Nadal-Ginard, 1986) du muscle squelettique ont été découverts. La structure primaire des isoformes de TnT cardiaque et squelettique, lentes et rapides, montre une très grande conservation de séquence. On distingue trois régions d'épissages alternatifs sur la chaîne polypeptidique de la TnT :

- un segment carboxy-terminal caractéristique de la TnT du muscle rapide codé par une paire d'exons mutuellement exclusifs,
- un segment central caractéristique de la TnT cardiaque,
- une région variable amino-terminale que l'on trouve pour les trois types de TnT.

ii) Polymorphisme

De multiples isoformes de TnT sont présentes dans le muscle squelettique dont l'expression pourrait être corrélée aux propriétés physiologiques de chaque type de fibres (Wu et coll., 1994).

Toutes les expériences de séquençage réalisées jusqu'à aujourd'hui montrent que la taille des TnT varie de 223 à 305 acides aminés. Cette variation est principalement due à la région amino-terminale. Ainsi, la région amino-terminale est codée par des combinaisons diverses de multiples exons alternatifs et présente une séquence très diversifiée. A l'extrémité de cette région les 10-15 premiers acides aminés sont très acides (glutamate en majorité) et assez conservés entre les différentes isoformes (Breitbart et coll., 1985). Si trois isoformes de TnT lentes (TnTs) ont été mises en évidence chez la souris résultant d'un épissage alternatif des exons 5 et 6 dans la région amino-terminale (Jin et coll., 1998). L'analyse par la technique de « RNase protection assay » semble indiquer que le gène humain codant pour la TnTs lente pourrait générer 3-4 transcripts qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'un insert court (33-48 nucléotides) dans les régions 3' et 5' (Gahlmann et coll., 1987 ; Samson et coll., 1994).

Cependant, six transcripts de TnTs chez le poulet ont récemment été décrits (Yonemura et coll., 2000 ; Yonemura et coll., 2002) suggérant une hétérogénéité des TnTs plus grande que celle rapportée jusqu'à présent. Quatre isoformes ont été clonées chez le rat (Kischel et coll., 2005).

La situation est plus complexe en ce qui concerne l'isoforme rapide de la TnT (TnTf) impliquant un épissage alternatif d'une paire d'exons de la terminaison carboxylique et de plus de 7 exons codant la région amino-terminale (Jin et coll., 2000). A partir de ces multiples combinaisons d'épissage, un nombre important de TnTf peut être généré. L'organisation moléculaire du gène de rat codant pour la TnTf montre sa capacité à produire 64 voire 128 transcripts différents par épissage alternatif (Breitbart et coll., 1985 ; Breitbart et Nadal-Ginard, 1987 ; Morgan et coll., 1993). 4-16 variants de TnTf de poulet ont pu être mis en évidence (Smillie et coll., 1988 ; Schachat et coll., 1995). Treize isoformes de protéines ont été identifiées chez la souris (Wang et Jin, 1998) et 11 isoformes l'ont été chez le poulet (Ogut et Jin, 1998). Cependant, seules cinq isoformes de TnTf ont pu être détectées puis séparées plus finement en 18 isoformes par électrophorèse bidimensionnelle en gradient de pH non équilibré chez le lapin (Härtner et coll., 1989 ; Sabry et Dhoot, 1991). Chez le rat, quatre isoformes sont couramment décrites (Bastide et coll., 2002 ; Stevens et coll., 2002).

La finalité de cette hétérogénéité est encore très mal connue. Un rôle de ces différentes isoformes de TnT dans les conditions physiologiques normales et pathologiques est suspecté. Ainsi, il a été démontré qu'il existait un remplacement des isoformes de TnT acides par des isoformes de TnT basiques durant le développement des muscles cardiaque et squelettique (Jin et coll., 2000). L'inclusion ou l'exclusion d'exons codant pour la partie amino-terminale est responsable de cette transition pour le muscle squelettique (Wang et Jin, 1997). L'épissage alternatif génère des variants de terminaison amino- terminale présentant trois spécificités : la séquence, la taille et la charge.

iii) Fonctions (figure 14).

Des études de relation structure-fonction à l'aide de fragments de TnT ont permis d'identifier deux fragments fondamentaux dans l'activité fonctionnelle de la molécule. Le fragment T1 (1-158) de la région amino-terminale (figure 14) interagit avec la partie carboxy-terminale de la Tm, incluant la partie amino-terminale de la molécule de Tm adjointe dans la conformation tête-queue de l'assemblage du filament fin (Pato et coll., 1981 ; White et coll., 1987). En outre, la séquence TnT (160-193) se lie au domaine carboxy-terminal de la TnC en

présence ou en absence de la séquence de la TnI (56-115) ou 96-139 contenant chacune la région inhibitrice primaire de la TnI (Blumenschein et coll., 2001).

Un fragment T2 de la région carboxy-terminale (159-259) (figure 14) se lie à la région centrale de la Tm et interagit (Mak et Smilie, 1981; Morris et Lehrer, 1984) avec la troponine I et la troponine C et l'actine (Pearlstone et Smillie, 1982 ; Heeley et coll., 1987 ; Perry, 1998).

Cependant la TnT n'a pas qu'un simple rôle structural : elle semble également avoir un rôle modulateur ce qui expliquerait le pourquoi d'une telle diversité d'isoformes (Maytum et coll., 2002).

La TnT joue un rôle dans 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 ; Bastide et coll., 2002 ; Kischel et coll., 2005). Elle module les interactions TnI-TnC (Cheung et coll., 1987), en réduisant l'affinité de la TnC pour la TnI. D'autre part, la TnT peut augmenter l'activité ATPasique de la myosine en présence de Ca^{2+} (Greaser et Gergely, 1971 ; Farah et coll., 1994 ; Malnic et Reinach, 1994). Malnic et coll., (1998) ont montré que la région amino-terminale de la TnT (1-191) pouvait reconstituer l'activation de l'ATPase en présence de calcium (Malnic et coll., 1998).

Le complexe des troponines est disposé tous les 7 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 Tm, région hautement flexible (Phillips et coll., 1986) permet le contrôle de la flexibilité de la Tm (Gordon et coll., 2000). Des mesures effectuées sur fibres pelées ont permis de montrer que le degré de coopérativité dépendait des isoforms de TnT (Schachat et coll., 1987 ; Greaser coll., 1988, Nassar et coll., 1991 ; Bastide et coll., 2002 ; Kischel et coll., 2005).

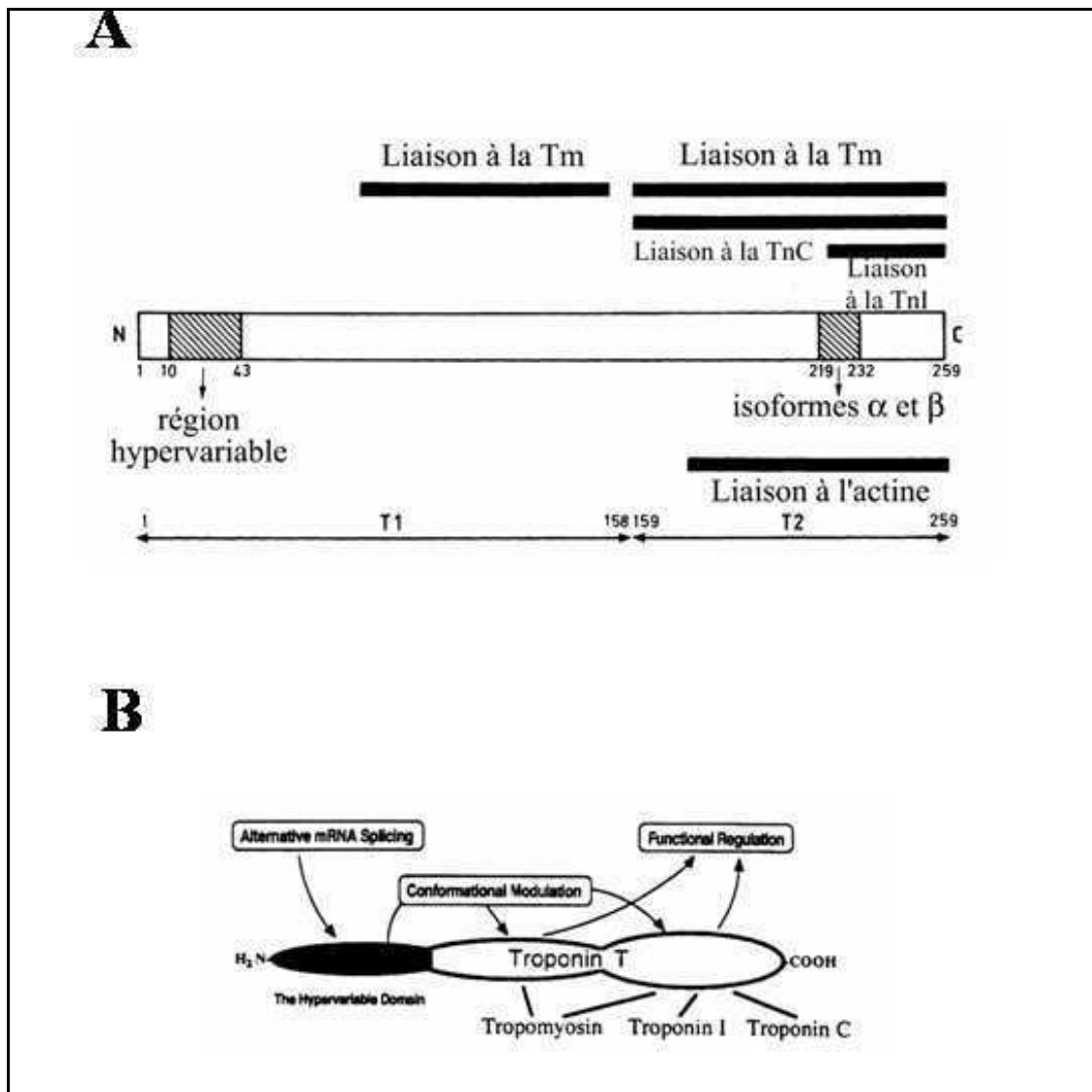


Figure 14 : Représentation schématique de la TnT squelettique rapide.

A. La TnT de lapin. Les régions hachurées correspondent aux régions variables entre les isoformes de TnT. Les lignes épaisses indiquent les régions d'interaction de la TnT et des protéines indiquées (d'après Perry, 1998).

B. Rôles fonctionnels des différents domaines de la troponine suivant le modèle proposé par Jin et coll., 2000.

Les domaines d'interaction avec les autres protéines sont indiqués par des traits épais.

En utilisant des systèmes reconstitués, il a été montré que la partie amino-terminale de la TnT augmenterait l'activité ATPasique de l'acto-myosine en présence de Tm (Malnic et coll., 1998). Cependant, le fragment 1-158 de la région amino-terminale peut inhiber l'activité ATPasique de l'acto-myosine (Maytum et coll., 2002). Ces différences pourraient être expliquées par les différences de séquences des parties amino-terminales des TnT, respectivement de poulet et de lapin, considérées dans ces études (Maytum et coll., 2002). L'implication de la région amino-terminale variable dans la conformation et la flexibilité de la TnT a également été démontrée (Wang et Jin, 1998). Il semblerait que cette région N-

terminale hypervariable pourrait moduler la conformation et la fonction des régions centrale et C-terminale de la TnT pour altérer son interaction avec la TnI et la tropomyosine (Biesiadecki et coll., 2007). L'ensemble de ces données concernant le rôle de la région variable amino-terminale peut être schématisée par le modèle proposé par Jin (2000, figure 14 B).

Des mutants ont été construits pour comprendre l'arrangement spatial de la TnT sur le filament fin en réponse à la liaison du calcium à la TnC (Kimura et coll., 2002). Ces résultats de fluorescence ont permis de démontrer que la TnT change sa position sur le filament fin au même titre que la TnI et donne lieu à trois états du filament fin: un état de relaxation, un état induit par le calcium ou état fermé, un état ouvert ou induit par la sous-unité S1 de myosine (Kimura et coll., 2002).

La partie amino-terminale présentant des épissages alternatifs ne se lie à aucune autre protéine connue du filament fin. Des molécules de TnT avec délétion de la région variable amino-terminale gardent leur activité dans l'activation calcium dépendante de l'ATPase actomyosine (Pan et coll., 1991 ; Fujita et coll., 1992).

Cette région variable n'apparaîtrait donc pas essentielle à l'activité de la TnT dans la régulation de la contraction par le calcium. Pourtant des études ont montré des différences fonctionnelles entre des isoformes de TnT qui diffèrent dans la région amino-terminale variable. Ainsi les isoformes de TnT cardiaque les plus acides contribuent à une meilleure tolérance de la performance des myofibrilles à l'acidité (Solaro et coll., 1988). Des expériences testant l'effet du pH sur l'interaction des TnT avec la TnI et la Tm montrent que cette interaction est moins altérée en ce qui concerne les TnT acides que pour les TnT basiques (Ogut et Jin, 1998). L'essentiel des TnTf du muscle adulte étant de type basique, le changement d'expression des TnTf au cours du développement d'isoformes acides néonatales à des isoformes basiques pourrait jouer un rôle important d'adaptation de la machinerie contractile de la fibre musculaire à son environnement physiologique comme l'acidose (Ogut et Jin, 1998). D'autres part, des fTnT différant entre elles de part la charge de leur région amino-terminale confèrent à des fibres squelettiques de poulet des sensibilités calciques différentes (Wang et Jin, 1998 ; Ogut et coll., 1999). Ainsi, l'expression d'isoformes de TnT dans les fibres musculaires lentes ou cardiaques plus acides que les isoformes de TnTf, conférerait à ces fibres une plus grande résistance à l'acidité, ce qui semblerait indiquer que la région amino-terminale a un réel rôle fonctionnel (Jin et coll., 2000).

d) La troponine C (figure 15)

La troponine C (C pour calcium) joue un rôle majeur dans la régulation de la contraction par le calcium : cette protéine est une protéine « calcium sensor » capable de détecter les variations de calcium cytosolique et de lever l'inhibition causée par la TnI.

i) Structure (figure 15)

La TnC est une protéine de 18 kDa (Parmacek et Leiden, 1991) appartenant à la famille des « Calcium Binding Proteins » (CaBP, Kretzinger, 1980). Elle se présente sous la forme de deux têtes globulaires correspondant aux régions amino- et carboxy-terminales reliées par une hélice centrale (Hertzberg et coll., 1987 ; Satyshur et coll., 1988). Chaque domaine globulaire comporte deux sites de liaison pour le calcium de type EF-Hand. Chaque motif EF-Hand est constitué de deux hélices α (figure 15) orientées à 90° , reliées par une boucle de 12 acides aminés. Six acides aminés sont impliqués dans la coordination d'un ion calcium : leurs positions sont dénommées X, Y, Z, -X, -Y, -Z (figure 15c). Cinq d'entre eux font partie de la boucle centrale et ont chacun une chaîne oxygénée libre. Le modèle de la TnC semble différent *in situ* par rapport au modèle proposé après cristallisation de la protéine, puisque les hélices D et E ne seraient pas colinéaires et que la région amino-terminale semblerait moins proche du domaine carboxy-terminal en absence de calcium que ce qui a été décrit précédemment (Ferguson et coll., 2003).

Aucune relation simple n'a pu être établie entre la séquence d'acides aminés de la boucle et l'affinité du domaine pour le Ca^{2+} , la séquence déterminerait seulement partiellement l'affinité et la spécificité (Marsden et coll., 1990). Au sein de la TnC, les quatre motifs EF-Hand ne sont pas identiques. La tête globulaire, carboxy-terminale possède deux sites (III et IV) à haute affinité ($K_d : 2 \cdot 10^{-2} \text{M}$) mais de basse spécificité qui sont occupés par le Mg^{2+} dans le muscle relâché (Zot et Potter, 1987) (figure 15a). La tête amino-terminale possède deux sites à basse affinité ($K_d : 3 \cdot 10^{-5} \text{M}$) mais à haute spécificité (Potter et Gergely, 1975) (figure 15a). La liaison du Ca^{2+} sur le site I est énergétiquement moins favorable que sur le site II (Li et coll., 1998).

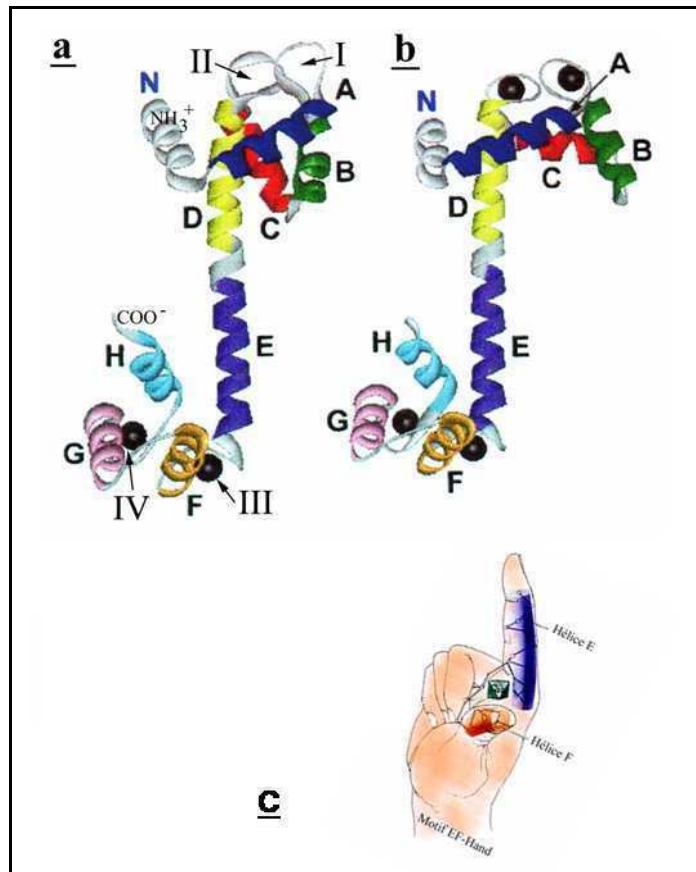


Figure 15 : Représentation de la structure cristalline de la TnC. A-H = hélices α . I-IV sites de fixation du Ca^{2+} (EF-Hand).

a. TnC squelettique de dindon avec 2 ions calcium liés sur les sites III et IV, le domaine amino-terminal étant en position fermée.

b. TnC squelettique de lapin. Tous les sites sont occupés. Noter la réorientation des hélices B et C par rapport aux hélices A et D correspondant à une conformation ouverte de la partie amino-terminale.

c. Description des motifs EF-Hand. L'index et le pouce représentent les hélices E et F. L'ion Ca^{2+} est piégé au sein d'une structure polyédrique (bipyramide pentagonale). Le fragment de la séquence d'acides aminés de la TnC impliqué dans la coordination du calcium dans les sites I et IV est représenté à gauche du modèle EF-Hand (modifié d'après Da Silva et Reinach, 1991).

La stabilité de la TnC et son affinité pour le calcium sont modulées par l'hydratation de la protéine (Suarez et coll., 2003).

ii) Polymorphisme

Trois isoformes de TnC ont pu être mises en évidence.

L'isoforme rapide du muscle squelettique ou TnCf est exprimée exclusivement dans les muscles rapides (Dhoot et Perry, 1979). Les isoformes lentes de TnC (TnCs) et cardiaques

(TnCc), respectivement plus spécifiques du muscle squelettique et du cœur, sont identiques (Wilkinson, 1980).

Cette protéine est particulièrement bien conservée (95 % d'homologie de séquence entre la souris et le poulet, Parmacek et Leiden, 1991) entre les espèces, ce qui semble signifier que son rôle est fondamental. Il y a près de 70 % d'homologie entre la TnCf et la TnCs, les différences étant localisées dans les 40 premiers acides aminés. Ainsi, une insertion en position 28 et une double substitution d'acides aminés (Leu 29 – Asp 30 ; Ala 31 – Asp 32) rendent le site I non fonctionnel pour la TnTs (Van Eerd et Takahashi, 1975 ; Burtneck et Kay, 1977 ; Leavis et Kraft, 1978).

iii) Fonctions (figure 16)

La TnC est une protéine « Ca^{2+} -sensor » qui va détecter les variations cytosoliques de Ca^{2+} .

En présence de concentrations physiologiques de calcium, les sites III et IV de la TnC sont occupés par le Mg^{2+} . Le déplacement du Mg^{2+} de ces sites par le Ca^{2+} est un phénomène trop lent pour rendre compte du déclenchement de la contraction rapide (Johnson et coll., 1979 ; Iio et Kondo, 1980 ; Robertson et coll., 1981). Ces deux sites ont par contre un rôle structural important puisqu'ils permettent la cohésion du domaine carboxy-terminal de la TnC avec la TnI et la TnT (Potter et Gergely, 1975 ; Zot et Potter, 1982). Le site III est également déterminant dans le maintien de la stabilité structurale de la TnC au sein du filament fin (Szczesna et coll., 1996b), alors que le site IV n'apparaît pas essentiel bien que contribuant également à cette stabilité (François et coll., 1995 ; Szczesna et coll., 1996b). Les sites I et II sont les sites régulateurs de la contraction. Ainsi des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que les sites I et II étaient nécessaires pour l'activité complète de la TnCs (Sheng et coll., 1990).

La TnCs ne possédant pas de site I, la mutation du site II abolit la contraction (Putkey et coll., 1989). L'activation du site I favoriserait le processus de coopérativité, ce qui semble indiquer que ce site ne fait que moduler le fonctionnement du site II (Kischel et coll., 2001).

La fixation du Ca^{2+} sur les sites régulateurs entraînerait un changement de conformation de la TnC (Herzberg et coll., 1986) (figure 15 a et b).

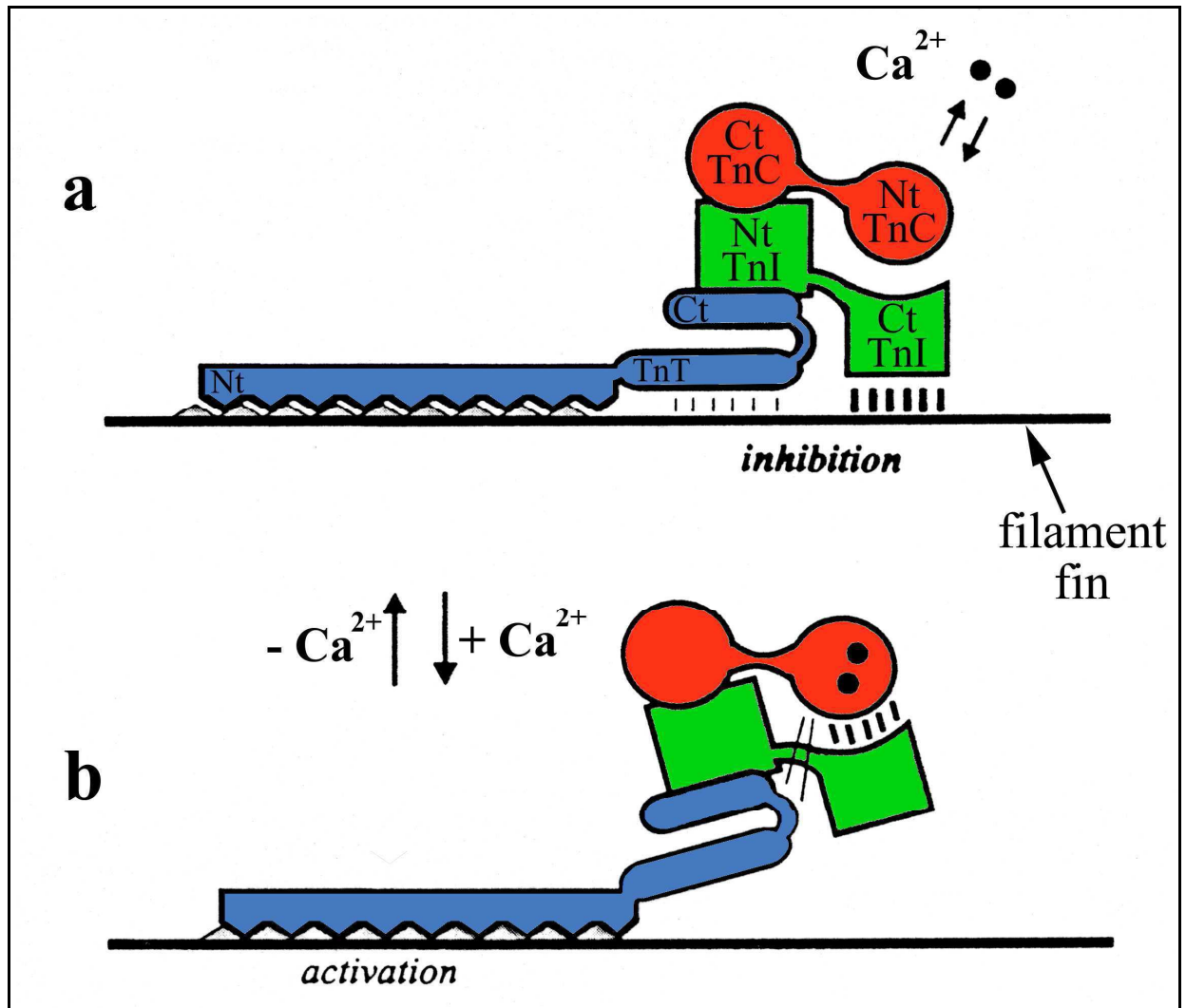


Figure 16 : Représentation schématique des interactions existantes entre la TnT (bleue), la TnI (verte), la TnC (rouge) et le filament fin d'actine-tropomyosine. La région amino-terminale de la TnI (1-58) interagit avec le domaine carboxy-terminal de la TnT (16-263) et le domaine carboxy-terminal de la TnC. Le fragment amino-terminal de la TnT interagit avec le filament fin. Ces interactions sont indépendantes du calcium et maintiennent la cohésion de l'ensemble du complexe. Les interactions dépendantes du calcium sont indiquées en noir (d'après Malnic et coll., 1998).

Ce changement de conformation démasque une séquence hydrophobe et induit l'interaction TnC-TnI. Le site I joue un rôle important dans ce changement de conformation. La TnC pour laquelle le site I est non opérationnel, va rester dans une configuration proche de la structure fermée suite à la fixation du calcium sur le site II (Sia et coll., 1997). L'interaction TnC-TnI sera donc différente de celle existant dans le muscle rapide.

L'importance des sites régulateurs de la TnC dans la régulation de la contraction a pu être mise en évidence à l'aide d'expériences d'extraction de la TnC et de son remplacement, sur fibres musculaires isolées. Il a pu ainsi être établi que l'isoforme de TnC influait sur les caractéristiques d'activation calcique. Les caractéristiques d'activation calcique des fibres rapides reconstituées avec une TnC lente ou cardiaque deviennent typiques de celles des fibres lentes (Moss et coll., 1986 ; Kischel et coll., 2001), tandis que la TnC rapide confère aux fibres lentes des caractéristiques d'activation similaires à celles des fibres rapides (Babu et coll., 1987 ; Gulati et coll., 1988 ; Kischel et coll., 2001).

Dans les fibres lentes, la mutation de l'unique site fonctionnel II abolit la contraction (Putkey et coll., 1989). La restauration du site I confère des propriétés d'activation calcique similaires à celles des fibres rapides (Sweeney et coll., 1990a), mais la contraction ne peut se faire si seul le site I est fonctionnel (Putkey et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1990a).

Dans les fibres rapides, l'activation par le site I uniquement est possible, mais la tension que la fibre peut générer n'est plus que de 50 % voire en deçà (Sheng et coll., 1990 ; Putkey et coll., 1991). Si la fonction du site I est abolie, une tension est partiellement obtenue (Sheng et coll., 1990). Chaque site peut donc faire fonctionner la protéine mais les deux sites sont nécessaires à son fonctionnement optimal.

L'activation du muscle s'effectue par la fixation de Ca^{2+} sur la TnC. Néanmoins, d'autres cations divalents peuvent activer la machinerie contractile : Sr^{2+} (Kasai et Oosawa, 1968 ; Donaldson, 1975), Ba^{2+} (Saito et coll., 1992) et Cd^{2+} (Stephenson et Thieleczek, 1986). Les pX_{50} sont cependant spécifiques de l'ion (X) considéré. Sur fibres pelées, la comparaison de la sensibilité au Ca^{2+} et au Sr^{2+} permet de différencier les fibres lentes et rapides: ainsi, les fibres lentes ou cardiaques sont plus sensibles au Sr^{2+} que les fibres rapides (Kitazawa, 1976 ; Kerrick et coll., 1980), ce qui permet d'identifier rapidement le typage d'une fibre musculaire (Takagi et coll., 1978 ; Hoar et Kerrick, 1979 ; Fink et coll., 1986 ; Stevens et coll., 1993). La TnC est à l'origine de cette sensibilité différente des fibres lentes et rapides au Sr^{2+} , comme l'ont démontré de nombreuses expériences d'extraction-remplacement (Babu et coll., 1987 ; Morimoto et Ohtsuki, 1988 ; Sweeney et coll., 1990a).

2. Mécanisme filamentaire de la contraction

L'établissement et la stabilisation d'un lien actine-myosine, ne sont pas, en soi, calcium-dépendants. Il a ainsi été démontré que la liaison des têtes S1 de myosine sur l'actine pouvait survenir en absence de Ca^{2+} à faible force ionique (Brenner et coll., 1984). De fait, pour

expliquer la nécessité des ions calcium libres dans le sarcoplasme pour l'activation de la contraction, il doit être admis la présence au niveau des myofilaments, d'un système qui rend calcium-dépendante l'interaction actine-myosine au niveau des ponts. Ce système fut identifié comme étant le complexe régulateur Tn-Tm. Il impliquerait un blocage stérique par encombrement de l'unité d'actine par la Tm qui lui est associée, et ce, sous contrôle du complexe des Tn (Haselgrove et Huxley, 1973 ; Huxley, 1973 ; Parry et Squire, 1973). Les ions calcium libérés par le stimulus d'un potentiel d'action, se fixent sur la Troponine C. La TnC agit comme un « sensor » calcique, détectant les variations cytosoliques de Ca^{2+} . Lors du largage de calcium par le réticulum sarcoplasmique, les sites I et II de la TnC fixent le Ca^{2+} , étant ainsi les sites régulateurs de la contraction. Un changement conformationnel de la TnC s'opère alors (Herzberg et coll., 1986). Le domaine N-terminal de la TnC, chargé en Ca^{2+} , présente alors une haute affinité pour la TnI (Wang et Cheung, 1985 ; Cheung et coll., 1987). La liaison entre TnI et actine se rompt, et la TnI forme un complexe avec la TnC. Dans cette conformation, la TnI ne maintient plus le complexe Tn-Tm dans sa position de blocage stérique. La Tm passe d'un état « off » inhibiteur, à un état « on » libérant les sites de fixation de l'actine. Cette transition d'état « off » → « on » n'empêche ainsi plus la liaison des têtes S1 de myosine aux sites de fixation de l'actine. Il est cependant à noter que dans un système reconstitué [Myosine-Actine-Tm-TnI-TnC], la TnC neutralise l'activité inhibitrice de la TnI en présence comme en absence de Ca^{2+} (Amphlett et coll., 1976). L'addition de la TnT fixée à la Tm dans le système [Myosine-Actine-Tm-TnI-TnC] induit un renforcement de l'inhibition de l'ATPase en absence de Ca^{2+} , et une augmentation de l'activité ATPasique en présence de Ca^{2+} (Greaser et Gergely, 1971 ; Malnic et Reinach, 1994). Pour que le système devienne sensible au calcium, la sous-unité de TnT est par conséquent nécessaire. Elle permet de transmettre le changement conformationnel au complexe des troponines (Tanokura et Ohtsuki, 1982 ; Leszyk et coll., 1990). L'étroite relation entre TnC et TnT et la dépendance de leur activité à la concentration calcique (Heeley et coll., 1987), suggèrent une transmission du signal activateur calcique par ces deux protéines (Potter et coll., 1995). Suite au dégagement des sites de fixation de l'actine à la myosine par le complexe Tn-Tm, les ponts actine-myosine se forment et la contraction musculaire a lieu.

I – E. La plasticité musculaire : transitions entre les différents types de fibres musculaires

1) Polymorphisme des fibres squelettiques

Un muscle, comme nous l'avons vu précédemment, est constitué de nombreuses fibres musculaires qui sont l'unité élémentaire contractile. Les fibres musculaires peuvent être purement rapides, purement lentes ou hybrides selon l'hétérogénéité des protéines contractiles qu'elles expriment en particulier les MHC. Ainsi, on a longtemps distingué des 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 et Staron, 1990). Cependant, il y a maintenant de nombreuses données qui montrent que le terme initial de fibre hybride en référence aux seules MHC est inadapté car les fibres présentent des patterns d'expression moléculaire 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.

La complexité de l'hybridisme peut être également illustrée par les possibilités suivantes :

- les fibres qui expriment deux, voire plus d'isoformes d'une même protéine : par exemple les fibres contenant plusieurs isoformes de Tm, Tn et de MLC ;
- les fibres exprimant une isoforme d'une protéine contractile mais plusieurs isoformes ou une autre isoforme sous la forme du transcript.

De plus, le set d'isoformes de protéines détecté dans des fibres exprimant des isoformes de deux, voire plus de protéines, peut être du même type (matched, lent ou rapide) ou de types non appariés (mismatched). Ainsi, un set de même type correspond à l'association d'isoformes rapides de MHC (IIa et IIb) et d'isoformes rapides de MLC (MLC_{1f}, MLC_{2f}, MLC₃), un set non apparié correspondant à l'expression d'isoformes d'un même type de MHC (lent ou rapide) à une coexpression d'isoformes lentes et rapides de MLC.

Ainsi, il serait plus approprié dorénavant d'indiquer pour quel type de protéine une fibre est hybride. L'hybridisme des fibres est donc multiple et présente un intérêt majeur pour les physiologistes pour comprendre :

- le rôle physiologique des diverses isoformes de protéines musculaires,
- la régulation de l'expression des gènes dans une cellule multinuclée.

2) 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. Cette plasticité va se développer en particulier dans des conditions physiopathologiques comme les maladies neuromusculaires. Ces dernières sont extrêmement diversifiées et se différencient par l'origine de l'affection, l'âge d'apparition, l'intensité du déficit, le mécanisme et l'évolution de l'atteinte. Elles ont cependant toutes en commun d'entraîner une diminution de la force musculaire et une dégradation de la fonction motrice. L'altération des capacités motrices est également l'une des conséquences de l'inactivité prolongée et du vieillissement. L'ensemble de ces syndromes est à l'origine de problèmes de motricité et d'équilibre qui deviennent avec le vieillissement de la population un véritable enjeu de santé publique. La perte de masse musculaire est aussi rencontrée dans de nombreuses pathologies telles que le sida, le diabète ou le cancer.

Il existe deux modèles permettant de mettre en jeu cette transformation phénotypique et le développement d'une atrophie fonctionnelle : le modèle de suspension du rat de Morey (Morey et coll., 1979 ; Musacchia et coll., 1980) ou les protocoles d'alitement prolongé (le bed-rest) chez l'humain. Ces modèles permettent d'étudier les mécanismes moléculaires qui sont à la base de la plasticité musculaire et leurs conséquences.

Dans le modèle de Morey, le train arrière du rat est soulevé par suspension du rat par la queue. L'animal peut se déplacer grâce à ses membres antérieurs, et avoir ainsi librement accès à l'eau et à la nourriture. Dans ces conditions, le système musculo-squelettique des membres postérieurs se trouve en hypodynamie (absence de charge corporelle) et en

hypokinésie (réduction des activités motrices), d'où la dénomination d'hypodynamie-hypokinésie (HH).

Le bed-rest consiste à coucher un sujet sur un lit incliné à -6° par rapport à l'horizontale ce qui provoque un transfert liquidien des membres inférieurs vers les parties supérieures de l'organisme. Cette position réduit l'effet de la gravité sur l'organisme et reproduit de nombreux facteurs environnementaux de l'espace (Droppert, 1993 ; Booth, 1994).

Ces deux modèles reproduisent certains aspects observés lors de la microgravité réelle et sont considérés comme deux modèles de choix pour l'étude des effets de la gravité sur le système neuro-musculaire.

3) Plasticité des fibres musculaires squelettiques dans le modèle d'hypodynamie-hypokinésie (HH)

Les effets d'une période d'HH sont variés ; tout d'abord, on observe une diminution de la masse du muscle, particulièrement bien marquée pour les muscles antigravitaires tels que le soleus (Oganov et coll., 1980 ; Desplanches et coll., 1987 ; Thomason et Booth, 1990 ; Roy et coll., 1991 ; Stevens et coll., 1993), s'accompagnant d'une diminution du contenu en protéines myofibrillaires de l'ordre de 50 % (après trois semaines de HH) (McDonald et 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 et 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 protéique (Steffen et Musacchia, 1985 ; Goldspink et coll., 1986 ; Thomason et coll., 1987 ; Edgerton et Roy, 1991). Le HH entraîne une diminution de la force développée par les muscles lents (Fitts et coll., 1986). Cette perte de force est due en partie à l'atrophie musculaire et à la diminution en protéines myofibrillaires (Thomason et coll., 1987). Cependant on mesure une perte de force relative des fibres musculaires attribuée à la diminution de la sensibilité calcique des fibres musculaires. Ainsi les fibres du soleus présentent des relations Tension/pCa possédant des seuils d'activation calcique plus élevés après HH (Caïzzo et coll., 1994 ; Caïzzo et coll., 1996 ; Stevens et coll., 1993).

Cette diminution de la sensibilité calcique est 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., 2002). La vitesse de raccourcissement des fibres de soleus est 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, 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 MHC IIB (Caiozzo et coll., 1998 ; Oishi et coll., 1998 ; Cros et coll., 1999 ; Stevens et coll., 1999).

Les propriétés métaboliques sont également modifiées (Desplanches, 1997). Une augmentation significative des enzymes glycolytiques (lactate déshydrogénase et phosphofructokinase) est rapportée dans le soleus ; celui-ci acquiert donc 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 la densité volumétrique des mitochondries 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 ; Fitts et coll., 2000 ; Grichko et coll., 2000). Enfin, les muscles lents présentent une plus grande susceptibilité à la fatigue musculaire, liée à une augmentation de l'utilisation du glycogène et une diminution de la capacité à oxyder les graisses (Baldwin et coll., 1993 ; Caiozzo et coll., 1994).

4) Plasticité des fibres musculaires squelettiques dans le bed-rest

Chez l'Homme, une immobilisation de trois à quatre mois provoque une atrophie de 30 % des muscles du mollet, soit 10 à 15 % de plus que celle subie par les muscles de la cuisse. Divers protocoles d'alitement prolongé ont permis d'étudier la plasticité du muscle humain soumis à une immobilisation. Ainsi une durée de dix-sept jours entraîne une atrophie et une transition phénotypique lent vers rapide des fibres de type I du muscle soléaire (Widrick et

coll., 1997) comme après deux et quatre mois de bed-rest (Ohira et coll., 1999). Ces transformations sont associées à une perte de force sans que la force relative ne soit modifiée et une accélération de la vitesse de raccourcissement des fibres de type I. Une augmentation du « filament spacing » pourrait être impliquée dans les modifications fonctionnelles observées (Riley et coll., 1998). Les fibres musculaires présentent une diminution de la sensibilité calcique et de la Po (Widrick et coll., 1998). Des résultats similaires, perte de force maximale de 38 % et atrophie de 14 % sont mesurés sur les fibres du soleus de femmes soumises à soixante jours de bed-rest (campagne Wise 2005) (Trappe et coll., 2008), comme chez l'homme après trente-sept jours (dans le VL) (Larsson et coll., 1996) ou quatre mois (Yamashita-Goto et coll., 2001) de bed-rest.

D'autres études réalisées sur le vastus lateralis, montrent que les fibres exprimant les MHC I ou MHC IIa présentent après quatre-vingt quatre jours de bed-rest, une diminution de leur diamètre, de leur force et de leur puissance. Une diminution de la Po et de la force normalisée est également mesurée (Trappe et coll., 2004). Ces résultats démontrent de nombreuses similitudes entre les effets de la microgravité réelle et une période de bed-rest (Widrick et coll., 1999 ; Adams et coll., 2003). Les exercices de résistances sont des stimuli hypertrophiques utilisés pour préserver les caractéristiques structurales (taille) et fonctionnelles des fibres musculaires au cours d'une immobilisation (Tesch et coll., 1990 ; Schultze et coll., 2002). Cependant, ces exercices de résistance seuls, permettent de préserver les caractéristiques contractiles des fibres rapides sans être bénéfiques pour les fibres lentes (Trappe et coll., 2004). Les protocoles d'exercice résistifs ont semblés être des contre-mesures de choix contre l'atrophie musculaire lors du BR. Cependant le protocole optimum n'est pas encore établi. Diverses études ont démontrées que le bénéfice était réel si le programme comportait des exercices musculaires excentriques et concentriques à haute intensité (Tesch et coll., 1990 ; Bamman et coll., 1998). Cependant, les exercices résistifs seuls permettent de préserver les caractéristiques contractiles des fibres rapides sans être réellement bénéfiques pour les fibres lentes (Trappe et coll., 2004).

En 2005, une campagne appelée WISE (Women's International Space Exploration) a été lancée pour (1) étudier les répercussions d'une immobilisation prolongée de 60 jours sur les caractéristiques des fibres des muscles soleus et vastus lateralis chez la femme et (2) tester les effets potentiellement protecteurs de deux contre-mesures : la combinaison de deux types d'exercices résistifs et aérobiques et d'une alimentation riche en leucine sur ces propriétés structurales et fonctionnelles des fibres de type I et de type II. Les travaux démontrent que les fibres soléaires de type I (MHC I) sont atrophiées de 14 % et présentent une chute de 38 % de

la P_o (force maximale absolue) après le bed-rest (Trappe et coll., 2008). La vitesse contractile (V_{max}) n'est quant à elle pas modifiée et la puissance résultante du produit de la P_o et de la V_{max} chute de 39 %. Ces auteurs ont montré aussi que la combinaison des deux types d'exercices (résistifs et aérobiques) maintenait cette puissance mais pas le diamètre et la P_o des fibres de type I et que le régime enrichi en leucine ne préservait pas les caractéristiques des fibres de type I (Trappe et coll., 2008).

Les mêmes analyses ont été faites sur le vastus lateralis. Dans cette étude, les exercices aérobiques combinés aux exercices résistifs préservent la taille et la fonction contractile des fibres de type I et IIa durant le bed-rest. Le régime alimentaire riche en leucine ne semble pas préserver le profil myocellulaire du vastus lateralis (Trappe et coll., 2007a). Le soleus et le vastus lateralis présenteraient donc une adaptation différente aux protocoles d'exercice.

II – La O-N-Acétylglucosaminylation.

II – A. Introduction

La glycosylation chez les Eucaryotes a longtemps été exclusivement restreinte à la surface cellulaire ou à la lumière de compartiments tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi ou le lysosome. Cette glycosylation a été comprise grâce à la localisation précise d'enzymes, les glycosyltransférases, greffant de manière spécifique un monosaccharide particulier sur un accepteur donné. La présence de glycosylation au sein des compartiments cytosoliques et nucléaires est longtemps restée énigmatique puisque aucun modèle de biosynthèse glycoprotéique ou de transport dans ces compartiments n'avait été validé. Par des expériences de reconnaissance lectinique ou de radiomarquage métabolique avec des sucres précurseurs, des glycosylations particulières ont pu être découvertes : les phospho-mannosyles *O*-liés, les oligosaccharides *O*-liés contenant du fucose, les protéoglycannes à mannose, l' α -glucosyl lié sur une tyrosine de la glycogénine, la *N*-acétylglucosamine sur l'hydroxyproline dans le cytosol, les glycosamoglycannes (GAG) dans le noyau et la *C*-mannosylation. Il est maintenant admis que la glycosylation majoritaire dans le cytosol et le noyau est la *O*-*N*-acétylglucosaminylation, ou *O*-GlcNAc.

Tableau V : Récapitulatif des différents types de *O*-Glycoprotéines.

Type de glycoprotéine	Acide aminé	Monosaccharide
Type mucine	Ser/Thr	GalNAc
Type protéoglycanne	Ser	Xyl
Type collagène	OH-Lys	Glc
Type glycogène	Ser/Thr	Glc
Type levure	Ser/Thr	Man
Type extensine	OH-Pro	Ara
Protéines cytosoliques et nucléaires	Ser/Thr	GlcNAc

II – B. La O-N-acétylglucosaminylation : la O-GlcNAc

1) La O-GlcNAc se démarque des autres types de glycosylation

a) La découverte de la O-GlcNAc

En 1984, l'équipe de G.W.Hart a mis en évidence ce nouveau type de glycosylation (Torres et Hart, 1984). A cette époque, il était clairement établi que la glycosylation des protéines membranaires intervenait dans les processus de reconnaissances antigéniques. C'est en s'intéressant à la distribution des oligosaccharides à résidus de N-acétylglucosamine terminaux que cette équipe a démontré un nouveau type de glycosylation différente de celles connues jusqu'alors puisqu'elle consiste en l'addition d'un seul monosaccharide, la N-acétylglucosamine (GlcNAc), sur des résidus sérine et thréonine de la chaîne peptidique des protéines. Ce résidu de GlcNAc est lié par une liaison bêta à la protéine. Par la suite, il n'est ni épimérisé, ni le substrat d'autre glycosyltransférase. Depuis l'idée selon laquelle les protéines glycosylées sont uniquement sécrétées ou associées aux membranes biologiques est complètement réfutée.

La O-N-acétylglucosaminylation des protéines nucléaires et cytosoliques est représentée schématiquement sur la figure 17.

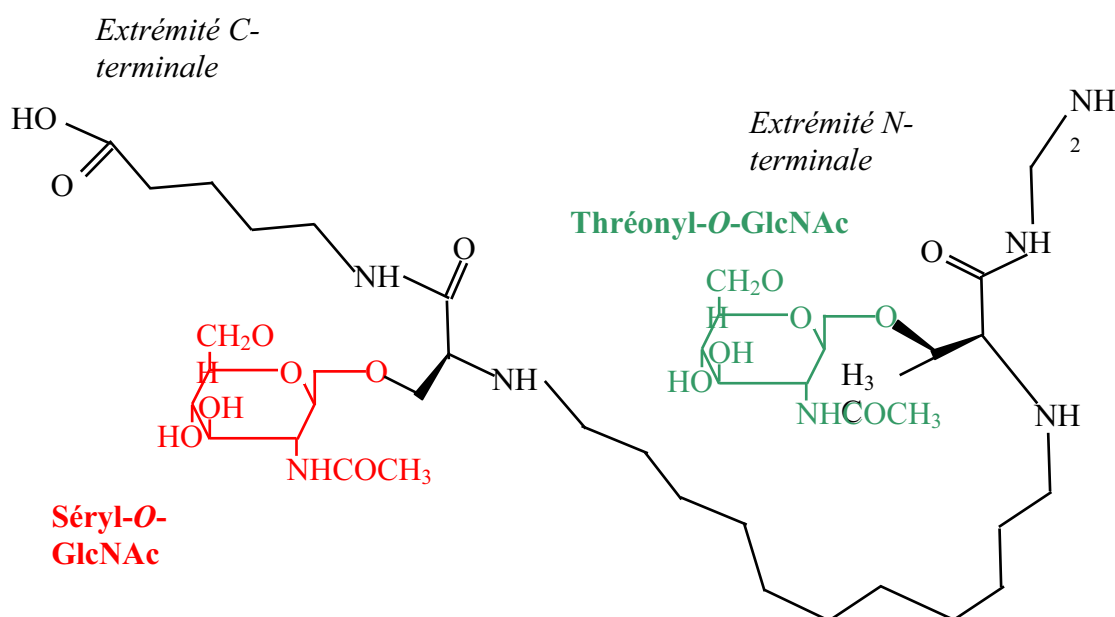


Figure 17 : Représentation schématique de la O-N-acétyl- β -D-glucosaminylation.

Généralités : la O-N-Acétylglucosaminylation

Tableau VI : Vingt deux faits marquants dans l'histoire de la O-GlcNAc.

Année	Evénement(s)	Référence(s)
1984	La O-GlcNAc est découverte de manière fortuite dans des lymphocytes.	Torres et Hart, J. Biol. Chem., 1984
1986-1987	La O-GlcNAc est particulièrement abondante dans les compartiments cytosolique et nucléaire.	Holt et Hart, J. Biol. Chem., 1986 Hanover et coll., J. Biol. Chem., 1987
1987	La face cytosolique du pore nucléaire est hautement modifiée par la O-GlcNAc.	Holt et coll., J. Cell Biol., 1987
1988	Première protéine virale modifiée par la O-GlcNAc (cytomégalovirus) Sp1 et d'autres facteurs de transcription sont O-GlcNAc- Implication de la O-GlcNAc dans les mécanismes transcriptionnels.	Benko et coll., PNAS, 1988 Jackson et Tjian, Cell, 1988
1989	Abondance de la O-GlcNAc sur les protéines de la chromatine.	Kelly et Hart, Cell, 1989
1990	Identification de l'OGT (O-N-acétylglucosaminyltransférase).	Haltiwanger et coll., J. Biol. Chem., 1990
1990-1992	Mise en évidence du dynamisme de la O-GlcNAc sur les lymphocytes activés par des agents mitogènes et sur des cytokératines 8 et 18.	Kearse et Hart, PNAS, 1991 Chou et coll., J. Biol. Chem., 1992
1993	Mise en évidence de la réciprocité entre la O-GlcNAc et la phosphorylation sur le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II.	Kelly et coll., J. Biol. Chem., 1993
1994	Caractérisation de la O-GlcNAcase (O-N-acétylglucosaminidase)	Dong et Hart, J.Biol.Chem, 1994
1996	La O-GlcNAc pourrait jouer le rôle d'un signal de translocation nucléaire.	Duverger et coll., Glycobiology, 1996
1997	Clonage de l'OGT. La O-GlcNAc jouerait un rôle de protection contre la dégradation protéasomale.	Kreppel et coll., J. Biol. Chem., 1997 Han et Kudlow, Mol. Cell. Biol., 1997
1998	Lien entre le métabolisme du glucose et la formation de la O-GlcNAc.	Yki-Jarvinen et coll., Metabolism, 1998
2000	L'OGT est essentielle pour la survie des cellules souches embryonnaires.	Shafi et coll., PNAS, 2000
2001	Clonage de la O-GlcNAcase. Hsc70 possède un site lectinique de reconnaissance de la O-GlcNAc.	Gao et coll., J. Biol. Chem., 2001 Lefebvre et coll., Biochem. J., 2001
2004	Première protéine bactérienne modifiée par la O-GlcNAc (flagelline de la Listeria). La O-GlcNAcase possède une activité Histone Acétyltransférase intrinsèque (NCOAT).	Schirm et coll., J. Bacteriol., 2004 Toleman et coll., J. Biol. Chem., 2004
2006	L'OGT et la O-GlcNAcase sont associées sous la forme d'un complexe moléculaire (O-GlcNAczyme).	Whisenhunt et coll., Glycobiology, 2006
2007	Implication de la O-GlcNAc dans la régulation des propriétés contractiles du muscle squelettique. Rôle crucial de la O-GlcNAc dans la transition G2/M chez <i>Xénopus</i> .	Hédou et coll., J. Biol. Chem, 2007 Dehennaut et coll., J. Biol. Chem, 2007
2008	Lors d'une déprivation en glucose, l'activité catalytique de l'OGT est régulée par une kinase p38. Les protéines kinases C sont aussi O-GlcNAcylées.	Cheug et coll., J. Biol. Chem, 2008 Robles-Flores et coll., Biochimica et Biophysica Acta, 2008

b) La O-GlcNAc, une modification post-traductionnelle dynamique

Contrairement aux autres glycosylations caractérisées par leur aspect stable, la O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle dynamique. En 1992, Chou et coll., démontrent que les cytokératines 8 et 18 humaines sont glycosylées sur différents sites avec un résidu de O-GlcNAc et que cette glycosylation est un processus dynamique puisque la demi-vie de la partie saccharidique est plus courte que celle de la protéine en elle-même (Chou et coll., 1992). En étudiant les effets de l'activation des lymphocytes T murins par un mitogène (concanavaline A ou esters de phorbol) sur des protéines O-GlcNAc, Kears et Hart ont également observé cet aspect dynamique de la glycosylation (Kears et Hart, 1991). En effet, le taux global de glycosylation varie de façon très rapide après l'activation et de façon transitoire. Ces niveaux de glycosylation changent également en réponse à de nombreux stress cellulaires (Zachara et coll., 2004).

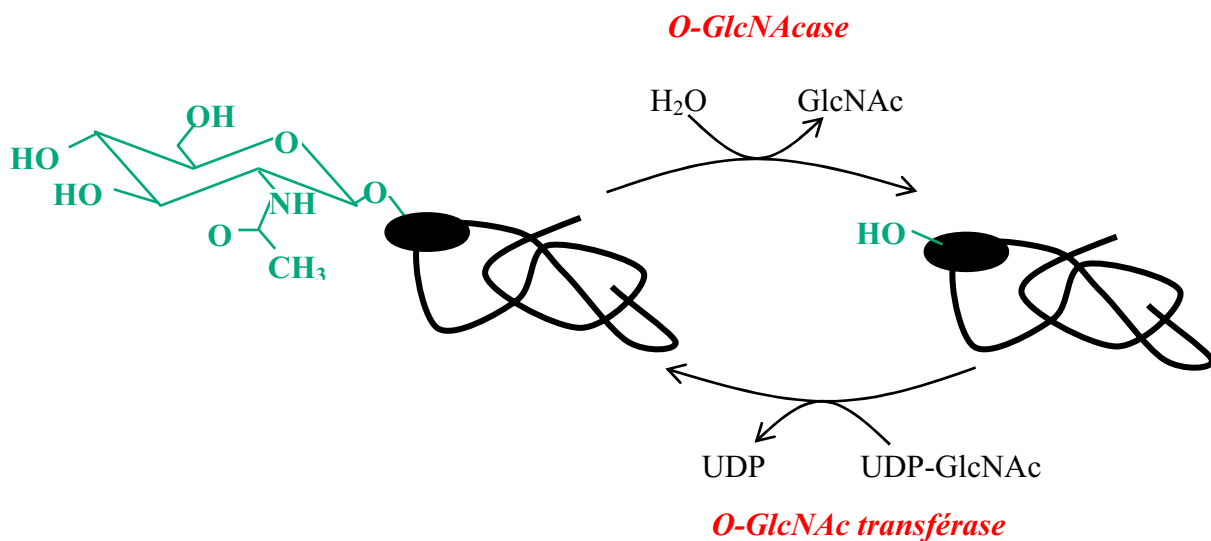


Figure 18 : La O-GlcNAc, une modification post-traductionnelle dynamique et réversible.

c) La O-GlcNAc est localisée majoritairement dans le cytosol et le noyau mais peut-être aussi dans les mitochondries

Des études de la topologie de la O-GlcNAc au sein de cellules primaires de lymphocytes ont permis de montrer que la O-GlcNAc est une glycosylation majoritairement retrouvée dans le cytosol et le noyau (Kears et Hart, 1991). Cependant, la présence du motif O-GlcNAc au niveau de la mitochondrie a récemment été mise en évidence par l'utilisation

d'anticorps reconnaissant spécifiquement le résidu O-GlcNAc de l'antigène H (Arvanitis et coll., 2005). Pourtant, l'équipe de Hanover, qui a découvert la forme mitochondriale de l'enzyme responsable de la O-GlcNAc, n'a jamais pu démontrer la présence de tels motifs dans cet organite.

d) La O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle ubiquitaire et très conservée

La O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle phylogénétiquement conservée puisqu'elle a été décrite chez de nombreux organismes incluant les virus (SV40 : Medina et coll., 1998 ; Plum pox virus : Chen et coll., 2005), les bactéries (*Listeria monocytogenes* : Schirm et coll., 2004), les invertébrés (*Caenorhabditis elegans* : Hanover et coll., 2005), les insectes (drosophile : Kelly et Hart, 1989), les mammifères et les plantes (*Arabidopsis thaliana* : Swain et coll., 2001). La présence de la O-GlcNAc a été mise en évidence chez les parasites mais dans une conformation de type alpha (*Plasmodium falciparum* : Dieckmann-Schuppert et coll., 1993). Enfin, la O-N-acétylglucosaminylation chez les levures est, à l'heure actuelle, un sujet controversé puisqu'aucune étude n'a permis de confirmer la présence de cette modification dans cet organisme.

e) La O-GlcNAc ne nécessite pas de séquence peptidique consensus

L'étude des séquences glycosylées a permis de constater qu'il n'existe pas de séquence peptidique consensus réelle, contrairement à d'autres types de glycosylation comme la N-glycosylation qui nécessite la présence d'une séquence Asn-X-Ser/Thr (X étant n'importe quel acide aminé, sauf la proline). Toutefois, des séquences telles que proline-sérine-sérine (PSS), proline-valine-sérine (PVS) ou des sites riches en acides aminés hydroxylés sont privilégiés pour cette glycosylation (Haltiwanger et coll., 1990).

L'identification des sites O-GlcNAc est essentielle pour comprendre les rôles fonctionnels de la O-GlcNAc dans des contextes biologiques spécifiques. L'observation directe du motif O-GlcNAc par spectrométrie de masse est difficile car la liaison glycosidique est très labile et facilement clivée dans la chambre de collision résultant en une fragmentation de petits peptides non détectables. De plus, il n'y a pas de région consensus qui dirige l'action de l'OGT.

Le développement d'outils chimiques couplés à la spectrométrie de masse facilite la localisation de petites séquences peptidiques, et cette combinaison peut être utilisée pour déterminer les sites exacts de glycosylation. Ainsi, une stratégie appelée BEMAD (pour β -élimination Michael addition with DTT) peut être utilisée pour identifier les sites de glycosylation. Dans cette approche, la GlcNAc subit une β -élimination et est ensuite remplacée par du DTT, un groupement sulfide stable pour les analyses MS/MS (Wells et coll., 2002a) (figure 19).

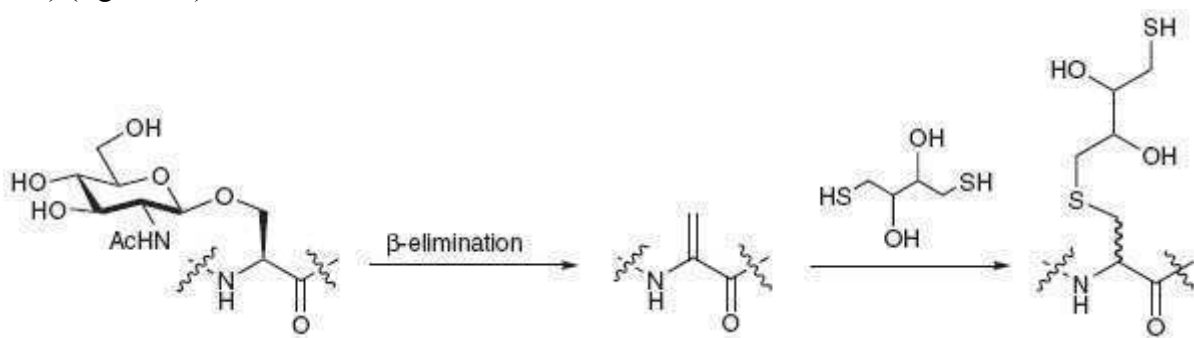


Figure 19 : Principe de la Bemad permettant l'identification des sites O-GlcNAc.

Une seconde approche peut également être utilisée pour l'identification des sites de glycosylation. Elle utilise l'UDP-galactose modifié en C2 par un groupement cétone ou azide. Contrairement à la BEMAD, cette approche permet de détecter directement le motif O-GlcNAc en spectrométrie de masse (Khidekel et coll., 2004).

De nouvelles approches en spectrométrie de masse telles que l'ETD (Electron Transfer Dissociation) et l'ECD (Electron Capture Dissociation) qui produisent une fragmentation peptidique sans perdre les modifications post-traductionnelles labiles telles que la phosphorylation ou la glycosylation promettent d'accélérer l'identification des sites modifiés (Syka et coll., 2004).

2) Les processus de O-N-acétylglucosaminylation sont régulés par un couple d'enzymes

Fonctionnant selon le même principe que le système kinases/phosphatases, le dynamisme de la O-GlcNAc est très vraisemblablement régulé par un seul couple d'enzymes antagonistes (alors que plus de 500 kinases et 150 phosphatases ont été répertoriées), la O-N-acétylglucosaminyltransférase (O-GlcNAc transférase ou OGT) qui transfère le résidu de GlcNAc sur les protéines cibles et la O-N-acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase) qui hydrolyse ce résidu.

a) La O-GlcNAc transférase greffe le résidu de GlcNAc sur les protéines
substrats

Les deux enzymes responsables du dynamisme de la O-GlcNAc ont été hautement conservées au cours de l'évolution (Iyer et Hart, 2003a) : des séquences codantes homologues pour l'OGT ont été retrouvées chez l'Homme et les archaebactéries et plus de 80 % d'identité sont retrouvés chez les Eucaryotes (Kreppel et coll., 1997). Comme nous l'avons mentionné plus haut, l'OGT semble être absente des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*, tout comme la modification post-traductionnelle correspondante.

Chez les autres organismes, l'organisation de l'OGT a été conservée. La protéine peut être sub-divisée en trois domaines. La partie N-terminale contient des TRP (tetratricopeptide repeat), domaines répétés de 34 acides aminés, retrouvés dans une grande variété de protéines, très répandus de la bactérie à l'Homme et permettant la modulation des interactions avec les protéines substrats (Blatch et coll., 1999) ; on trouve ensuite un domaine intermédiaire de liaison (dit « linker ») de la partie N-terminale à la partie C-terminale, cette dernière possédant l'activité catalytique. Le nombre de TRP varie de 1 à 16 en fonction de l'organisme mais également en fonction de la localisation sub-cellulaire de l'enzyme. Chez l'homme, l'OGT est codée par un seul gène localisé en Xq13 (Shafi et coll., 2000). Cette région est particulièrement intéressante puisque le locus de la dystonie parkinsonienne (DYT3) est également localisé dans cette région (Nolte et Muller., 2002). Le gène codant l'OGT possède 23 exons et se trouve sous le contrôle de deux promoteurs (P1 et P2) (figure 20). Ainsi plusieurs isoformes issues d'épissages alternatifs sont produites. L'isoforme la plus longue, de 116 kDa, est retrouvée dans le cytosol et le noyau (ncOGT) et contient 11,5 TRP (Iyer et Hart, 2003b) qui lui permettent de s'homotrimériser, alors que l'isoforme mitochondriale (mOGT), issue de la transcription à partir du deuxième promoteur (P2), possède 9 TRP et a une masse de 109 kDa. La mOGT possède une séquence d'adressage à la mitochondrie en N-terminal (Love et coll., 2003). Une isoforme plus petite (sOGT, pour « small OGT ») ne possède que 3 TRP pour une masse de 70 kDa. Il semblerait que cette OGT ait une capacité de glycosylation restreinte puisqu'aucun des substrats testés par Lazarus et coll., (Lazarus et coll., 2006) n'est modifié par cette isoforme. En contrepartie, ces auteurs ont démontré une certaine spécificité de substrat liée au nombre de TRP portés par l'OGT. Ainsi, la ncOGT et la mOGT catalysent le transfert de la GlcNAc sur Nup62 et la caséine kinase II alors que la O-GlcNAcase et tau ne

sont modifiées que par la ncOGT et que la tyrosine kinase YES n'est glycosylée que par la mOGT (Lazarus et coll., 2006).

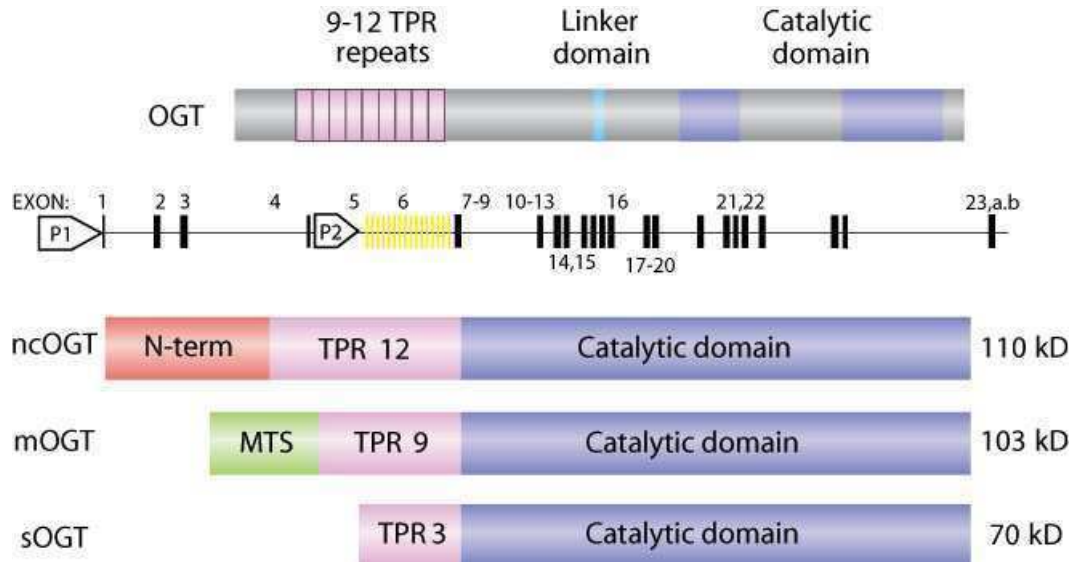


Figure 20 : Les domaines structuraux des différents isoformes de l'OGT (d'après Love et Hanover, 2005).

Le domaine catalytique de l'OGT, porté par la région C-terminale, contient deux motifs du type Rossman (Wrabl et Grishin, 2001). Ce motif a été retrouvé par comparaison de l'OGT avec des enzymes utilisant l'UDP-GlcNAc. La présence de ce motif classe ainsi l'OGT parmi la superfamille des glycogènes phosphorylases/glycosyltransférases (GPGTF).

L'OGT est retrouvée dans tous les tissus mais elle est plus fortement exprimée dans les cellules bêta du pancréas et le cerveau.

Plusieurs partenaires interagissant avec l'OGT ont été décrits. Parmi ceux-ci nous pouvons citer GRIF1 (GABA_A receptor-interacting factor R1) et son homologue OIP106 (OGT-interacting protein-106) (Iyer et coll., 2003), l'ARN polymérase II, mSin3A (qui recruterait l'OGT vers la machinerie transcriptionnelle permettant l'inhibition de la transcription par glycosylation) (Yang et coll., 2002) et dernièrement une interaction de l'OGT avec la sérine/thréonine phosphatase 1 (sous-unités β et γ) a été décrite (Wells et coll., 2004). Cette interaction OGT/PP1 β/γ permettrait la déphosphorylation préalable du substrat avant sa modification par la O-GlcNAc.

L'OGT possède une forte affinité pour l'UDP-GlcNAc (Haltiwanger et coll., 1992). L'affinité de l'OGT serait capable de s'adapter aux concentrations variables d'UDP-GlcNAc cellulaire (du μM au mM) dépendant principalement des conditions de nutrition (UDP-GlcNAc provient de diverses origines métaboliques telles que celles du glucose, des acides gras, des nucléotides...) (Kreppel et Hart, 1999).

b) La O-GlcNAcase hydrolyse le résidu de GlcNAc des protéines modifiées

La O-N-acétylglucosaminidase avait été identifiée à l'origine comme une hyaluronidase associée aux méningiomes et, pour cette raison, avait été appelée MGEA5 pour *Meningioma expressed antigen-5* (Heckel et coll., 1998). Le gène MGEA5 est localisé sur le chromosome 10 dans la région 10q24.1-q24.3, région associée à de nombreux troubles neurodégénératifs dont la maladie d'Alzheimer (Bertram et coll., 2000 ; Myers et coll., 2000) et code au moins deux transcrits d'épissages alternatifs très largement répandus dans tous les tissus de mammifères. L'appellation hyaluronidase lui provient de l'analogie de sa partie N-terminale avec les hyaluronidases de *C.elegans* (Heckel et coll., 1998).

La région C-terminale de l'enzyme porte des caractéristiques communes à la famille GCN5 des acétyltransférases (Schultz et Pils, 2002) et porte sur les asparagines 174-175, les sites actifs de la O-GlcNAcase (Çetinbas et coll., 2006). Ainsi le domaine C-terminal de la O-GlcNAcase possède une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque (Toleman et coll., 2004) qui serait incomplète et qui nécessiterait des protéines accessoires pour fonctionner pleinement. La O-GlcNAcase a été nommée NCOAT pour « Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransferase »

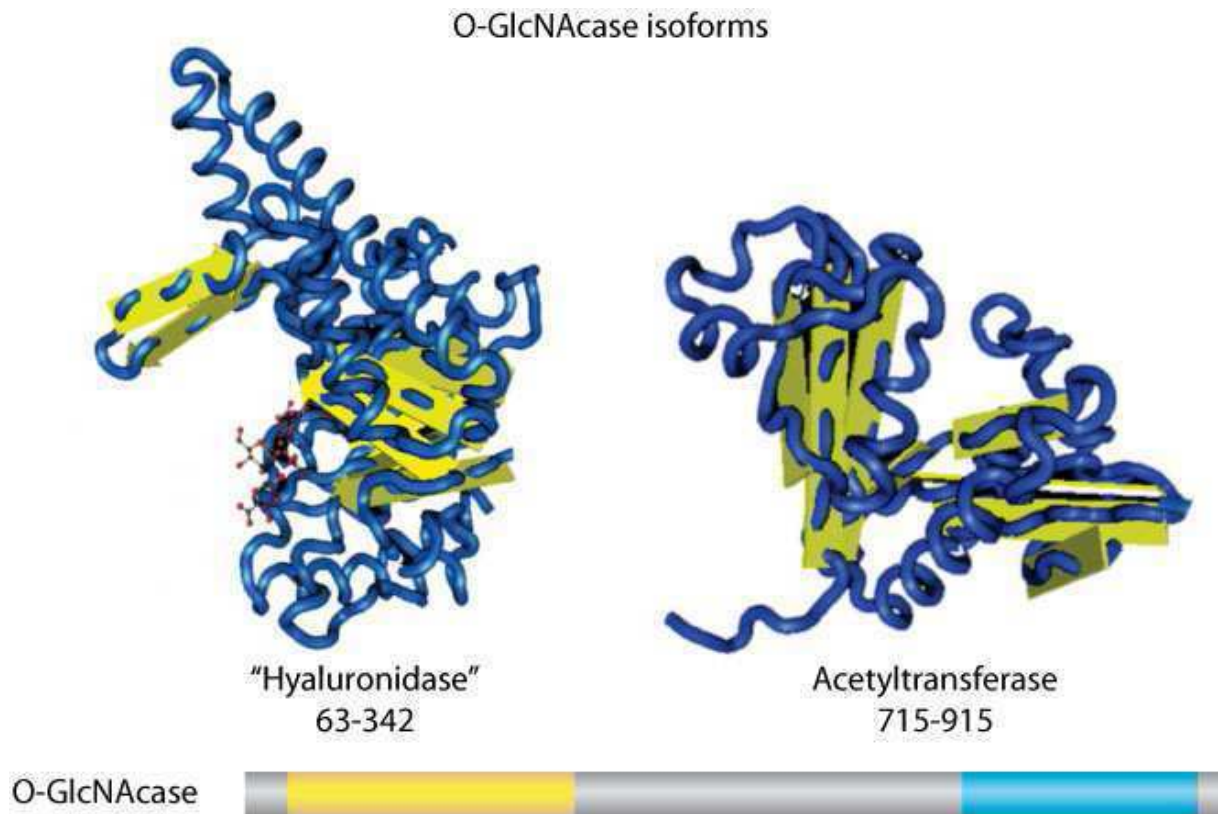


Figure 21: Domaines structuraux des isoformes de la O-GlcNAcase (d'après Love et Hanover, 2005).

La mise en évidence de cette activité HAT apparaît de toute première importance puisqu'il a été démontré que la O-GlcNAc pouvait réprimer la transcription en interagissant avec des histones désacétylases (HDAC) par le biais du co-répresseur mSin3A (Yang et coll., 2002). L'OGT et la O-GlcNAcase seraient donc toutes les deux impliquées dans l'activité transcriptionnelle ; d'une part l'activité O-GlcNAcase de NCOAT viendrait contrecarrer l'effet inhibiteur de l'OGT sur les composants de la machinerie transcriptionnelle (et ainsi l'activer) et d'autre part, l'activité HDAC associée à l'OGT ou l'activité HAT intrinsèque à NCOAT permettrait le remodelage de la chromatine, se traduisant par une répression transcriptionnelle dans le premier cas ou par une activation dans l'autre.

Il a été décrit très récemment que l'OGT et NCOAT pouvaient faire partie d'un complexe unique appelé O-GlcNAczyme (Whisenhunt et coll., 2006). L'interaction entre les deux enzymes antagonistes permettrait de renforcer encore l'effet coopératif des activités HDAC/OGT et des activités O-GlcNAcase/HAT.

Généralités : la O-N-Acétylglucosaminylation

Plusieurs partenaires de la O-GlcNAcase ont pu être identifiés (Wells et coll., 2002b). Parmi ceux-ci nous pouvons citer Hsp110, Hsc70, DRP-2, l'amphiphysine et la calcineurine.

Il existe plusieurs inhibiteurs de la O-GlcNAcase : la streptozotocine (Kaneto et coll., 1995), le PUGNAc (Dong et coll., 1994 ; Haltiwanger et coll., 1998), le NAG-thiazoline (Matthews et coll., 2007), l' α -GlcNAc Thiosulfonate (Kim et coll., 2007) et le Thiamet-G (Yuzwa et coll., 2008).

Tableau VII : Récapitulatif des caractéristiques des enzymes de la O-GlcNAc.

	OGT	O-GlcNAcase
Année de mise en évidence	1990	1991
Année de clonage de l'ADNc	1997	2002
Masse apparente en SDS-PAGE	Hétérotrimère $\alpha 2\beta$ de 340kDa Sous-unité α : 110 Sous-unité β : 78	Hétérodimère $\alpha\beta$ de 106 kDa Sous-unité α : 54 Sous-unité β : 51
Expression tissulaire	Tous les tissus et plus particulièrement dans le pancréas et le cerveau	Tous les tissus et plus particulièrement dans le placenta et le cerveau
Localisation cellulaire	Noyau et cytosol	Noyau et cytosol
Inhibiteurs	Alloxane, BADGP, dérivé benzoxazolinone (XI)	Streptozotocine, PUGNAc, NAG-thiazoline, α -GlcNAc Thiosulfonate et Thiamet-G
Modifications post-traductionnelles	Phosphatase sur tyrosine O-GlcNAc	Substrat de la caspase-3 (Asp 413)
Caractéristiques structurales	Possède 11 TRP en N-terminal et l'activité catalytique est portée par l'unité α	Possède deux domaines Nt : hyaluronidase Ct : histone acétyltransférases

c) Le résidu de GlcNAc provient de la voie métabolique des hexosamines et en partie du glucose extracellulaire

L'uridine-diphospho N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc est le nucléotide sucre donneur pour l'addition de GlcNAc sur les protéines. La synthèse d'UDP-GlcNAc à partir du glucose se fait par la voie des hexosamines-6-phosphate (HBP, « hexosamine biosynthetic pathway ») selon un processus extrêmement régulé. Le glucose extracellulaire pénètre dans la cellule via des transporteurs spécifiques GLUT. Une fois entré dans la cellule, le glucose est immédiatement phosphorylé par la glucokinase, générant ainsi du glucose-6-phosphate qui pourra entrer dans la voie des pentoses phosphates, participer à la synthèse du glycogène ou être épimérisé en fructose-6-phosphate par l'intervention de la glucose-6-phosphate isomérase. Le fructose-6-phosphate ainsi formé va pouvoir fournir de l'énergie par son entrée dans la voie de la glycolyse ou être le substrat d'une enzyme-clé de la synthèse de la O-GlcNAc, la glutamine : fructose-6-phosphate amido transférase ou GFAT. Cette enzyme permet la synthèse de la glucosamine-6-phosphate qui permettra à son tour la synthèse d'un nucléotide sucre, l'UDP GlcNAc (Marshall et coll., 1991) après l'intervention notamment de la GlcNH₂ acétyltransférase ou EMeg-32. L'UDP-GlcNAc ainsi formé participe à la glycosylation complexe des lipides et des protéines, à la synthèse d'autres nucléotides et à la modification des protéines nucléaires et cytosoliques par la O-GlcNAc. Cette voie de biosynthèse est extrêmement régulée par deux enzymes clés, la GFAT et EMeg-32. La GFAT est considérée comme l'enzyme limitante à la formation de la O-GlcNAc puisque l'UDP-GlcNAc, qui est le nucléotide-sucre donneur pour la formation de la O-GlcNAc, est un inhibiteur de cette enzyme par un mécanisme de rétrocontrôle. Elle est également inhibée par la phosphorylation. Cependant EMeg-32 est également une enzyme importante puisqu'elle gouverne le maintien correct des concentrations intracellulaires en UDP-GlcNAc. La GFAT est une enzyme cytosolique contrairement à EMeg-32 qui est une enzyme associée à la membrane (Boehmelt et coll., 2000).

On estime que deux à 5 % du glucose extracellulaire sont dirigés vers la synthèse de l'UDP-GlcNAc (Zhivkov et coll., 1975). Les niveaux de O-GlcNAc sur les protéines cellulaires peuvent donc être modulés en altérant les niveaux de glucose extracellulaires. La surexpression de la GFAT, résulte en une augmentation de l'UDP GlcNAc responsable d'une hyper-insulinémie et d'une résistance à l'insuline (cf partie O-GlcNAc et maladies humaines). La glucosamine permet d'augmenter artificiellement le taux de O-GlcNAc, dans le sens où elle est transformée en glucosamine-6-phosphate et entre directement dans la voie de

biosynthèse des hexosamines en contournant la GFAT, l'enzyme limitante de cette réaction. De la même façon, il a été démontré que l'administration de glucosamine induit rapidement une résistance à l'insuline (Robinson et coll., 1995).

La figure 22 schématise la voie de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc.

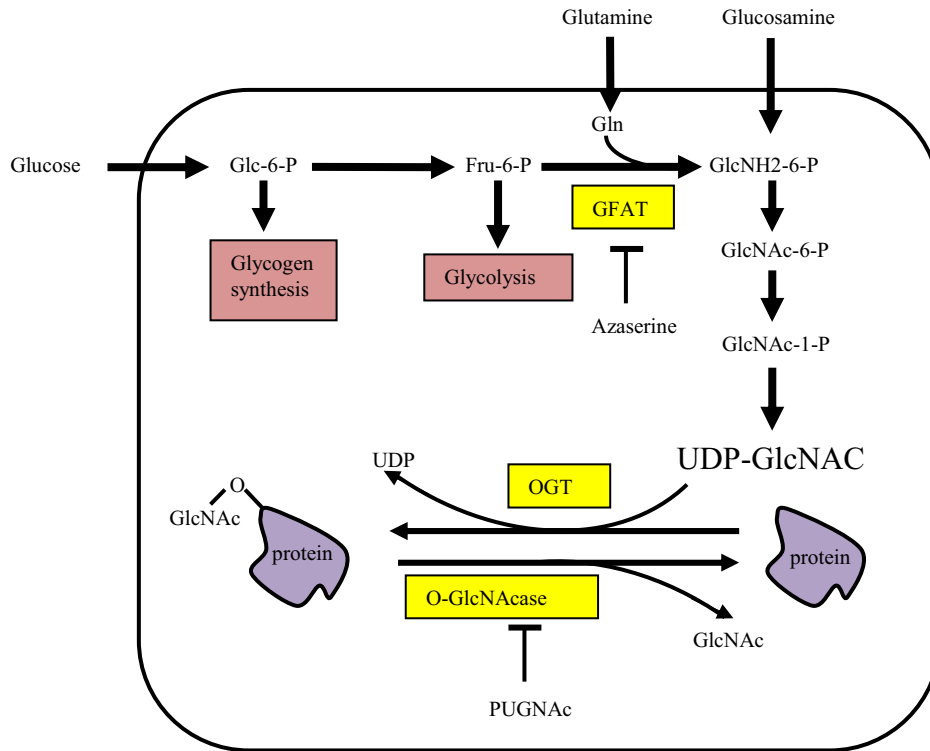


Figure 22 : Schématisation de la voie de biosynthèse des hexosamines. Glc : glucose ; Fru : fructose ; Gln : glutamine ; GlcNH2 : glucosamine ; GlcNAc : N-acetylglucosamine ; UDP-GlcNAc : Uridine 5'-Diphospho-N-acetylglucosamine ; GFAT : glutamine : fructose 6-phosphate amidotransférase ; OGT : uridine diphospho-N-acetylglucosamine : polypeptide β-N-acetylglucosaminyltransférase ; O-GlcNAcase : N-acetylglucosidase ; PUGNAc : O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino N-phenyl Carbamate (d'après Fülöp et coll., 2007).

II – C. Fonctions supposées de la O-GlcNAc

Depuis 1984, les travaux relatifs à cette glycosylation atypique n'ont cessé d'augmenter. A l'heure actuelle, plus de 600 protéines ont été identifiées comme étant des protéines à O-GlcNAc et ces protéines sont impliquées dans presque tous les aspects du métabolisme cellulaire (Wells et coll., 2001 ; Love et coll., 2005 ; Zachara et coll., 2006).

La figure 23 met en évidence la grande variété des protéines modifiées par la O-GlcNAc, tandis que le tableau VIII dresse une liste non exhaustive des protéines-O-GlcNAc.

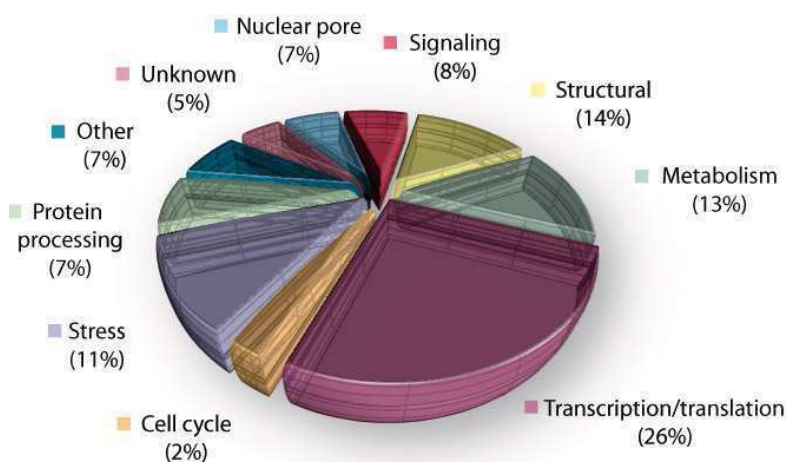


Figure 23 : Le O-GlcNAc (d'après Love et Hanover, 2005).

Tableau VIII: Exemples de protéines O-GlcNAc (d'après Zachara et coll., 2006).

Protein group	Example(s)
Nuclear pore proteins	Nuclear pore proteins p54, p62, p153, p155, p180, p153, p214 and p358.
Transcription factors	Sp1, AP-1 (c-fos and c-jun), CTF, hepatocyte nuclear factor 1, pancreas-specific transcription factor, serum response factor, p53, β -catenin, ELF-1, NF κ B, PAX-6, Oct1, c-myc, RB, V-erbA, and ER- β .
Polymerase(s)	Large subunit of RNA Pol II.
RNA binding proteins	hnRNP G (La-antigen), Ewing sarcoma RNA-binding protein, eukaryotic initiation factor 4A1, elongation factor 1- α and 40S ribosomal protein s24.
Phosphatases, kinases and adapter proteins	Nuclear tyrosine phosphatase p65, casein kinase II, AKT, insulin receptor substrate 1,2, GSK-3 β , and PI3-kinase.
Cytoskeletal proteins	Keratins 8, 13, 18, neurofilaments H, M, L, talin, vinculin, Band 4.1, ankyrinG, E-cadherin, synapsin 1, myosin, cofilin, α -tubulin, dynein LC1, MAP 2 and 4, Tau, β -synuclein, Piccolo, AP-3 and -180, β -APP, and adenovirus type 2 and 5 fiber proteins.
Chaperones	HSP 27, Hsc70, and Hsp90.
Enzymes	eNOS, GS (glycogen synthase), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, enolase, pyruvate kinase, UDP-glucose pyrophosphorylase and OGT.

Malgré les nombreuses études effectuées sur la O-GlcNAc, le ou les rôles associés à cette glycosylation ne sont pas clairement établis et semblent multiples. Cependant, certains rôles émergent. De nombreux travaux tendent à attribuer à l'addition de la O-GlcNAc un effet antagoniste à la phosphorylation. De plus, la modification des niveaux de O-GlcNAc a permis de montrer qu'elle pouvait jouer un rôle sur le comportement des protéines en modulant les

interactions protéine-protéine, les activités enzymatiques proprement dites ou leur régulation, la fixation à l'ADN, la localisation cellulaire et la demi-vie des protéines.

1) La *O*-GlcNAc : une modification analogue ou antagoniste à la phosphorylation/Théorie du « ying-yang »

Par le fait que la *O*-GlcNAc soit une modification dynamique qui affecte des résidus de sérine ou de thréonine, un parallèle a très vite été établi entre la *O*-N-acétylglucosaminylation et la phosphorylation. A l'instar de la phosphorylation, la *O*-GlcNAc interviendrait dans la régulation de nombreux processus cellulaires par la régulation même de la phosphorylation des protéines. En effet, de nombreuses études ont montré que les niveaux de *O*-GlcNAc varient sous l'effet des mitogènes (Kearse et Hart, 1991), de signaux cellulaires (Kneass et Marchase, 2004), de facteurs de croissance (Gandy et coll., 2006) et du développement cellulaire (Slawson et coll., 2002).

L'analyse précise des sites modifiés par la *O*-GlcNAc au niveau des protéines a montré que ces sites pouvaient être similaires à ceux affectés par les protéines kinases. Toutes ces données ont permis d'établir l'hypothèse du « ying-yang », selon laquelle la phosphorylation et la *O*-GlcNAc pourrait entrer en compétition pour des sites identiques de la protéine. Autrement dit, la phosphorylation d'un acide aminé empêcherait la fixation de *O*-GlcNAc et inversement. Un système quaternaire où une protéine A pourrait être soit *O*-GlcNAc (état B), soit phosphorylée (avec une exclusion des deux modifications au niveau d'un même site) (état C), soit les deux à la fois (état D), serait le point de départ de nombreuses régulations (figure 24).

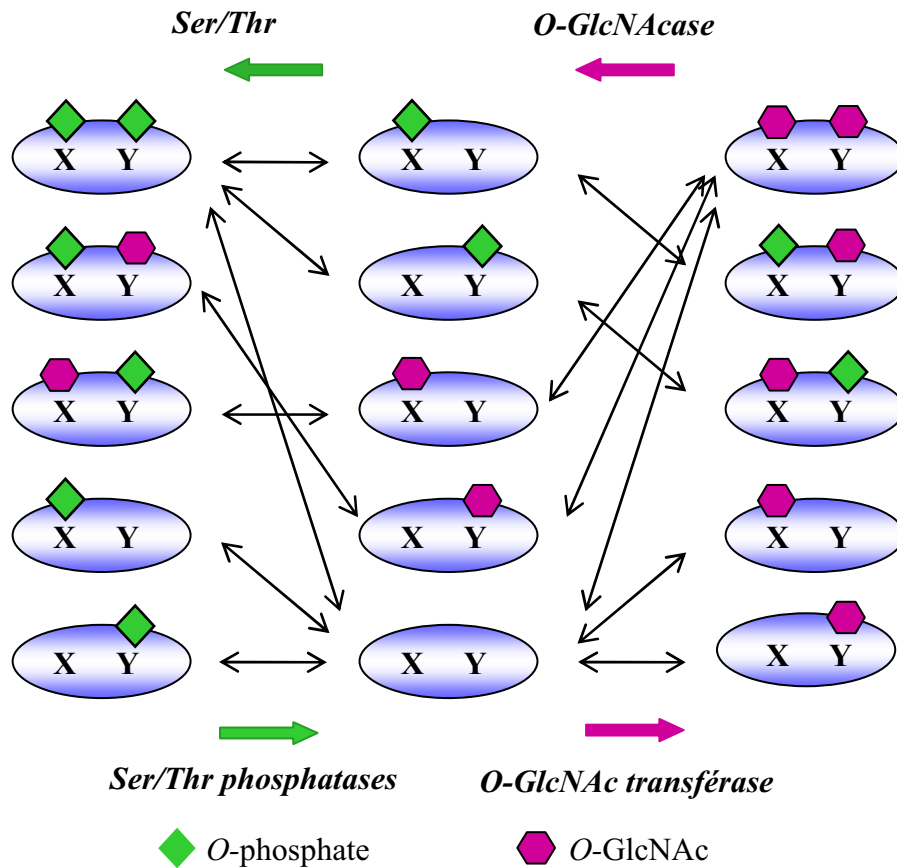


Figure 24 : Compétition entre la phosphorylation et la O-N-acétylglucosaminylation pour une protéine présentant deux sites de modification. La phosphorylation et la O-GlcNAc peuvent modifier un même site ou des sites adjacents (d'après Akimoto et coll., 2003).

Ce mécanisme a été démontré pour le récepteur aux estrogènes bêta (ER- β) où la « balance » O-GlcNAc/phosphorylation sur un résidu de sérine 16 interviendrait dans la régulation de la transactivation. De plus, cette sérine se trouvant dans un motif PEST, responsable de la dégradation du récepteur lorsque ce motif est phosphorylé, imputerait à la O-GlcNAc un effet sur le « turn-over » du récepteur (Jiang et Hart, 1997).

Medina et coll., ont montré que l'antigène large T du SV40 est modifié par la O-GlcNAc sur un site connu comme étant phosphorylé (sérines 111 et 113) et impliqué dans l'efficacité de répllication du SV40.

Il a été montré que c-myc existe sous trois formes au niveau du résidu thréonine 58 : une forme phosphorylée, une forme O-GlcNAc et une forme non modifiée (Hart et coll., 1995). La phosphorylation de la thréonine 58 nécessite au préalable la phosphorylation de la sérine 62 et la mutation de cette sérine entraîne une diminution de phosphorylation de la

thréonine 58 avec, par contre, une augmentation de sa glycosylation. Ces données montrent que la balance *O*-GlcNAc/phosphorylation au niveau du résidu de thréonine 58 régule les fonctions de c-myc dans la cellule.

Cette relation entre la *O*-GlcNAc et la phosphorylation a pu être clairement montrée en comparant les niveaux de ces modifications post-traductionnelles avant et après l'utilisation d'inhibiteurs de kinases et de phosphatases. Le traitement de cellules avec des inhibiteurs de phosphatases comme l'acide okadaïque, provoque une augmentation des formes phosphorylées des protéines en association à une diminution du taux global de glycosylation (Lefebvre et coll., 1999 ; Griffith et coll., 1999).

L'OGT se trouve complexée à la phosphatase 2 (PP2A), validant l'idée selon laquelle les deux modifications post-traductionnelles, *O*-GlcNAc et phosphorylation, s'excluraient mutuellement pour un même site, ou que la modification d'un résidu nécessiterait au préalable la modification d'un autre résidu.

2) La *O*-GlcNAc module les interactions protéine-protéine

Etant donné que le résidu de phosphate est anionique alors que le résidu de GlcNAc est neutre, l'addition de l'une ou de l'autre de ces modifications post-traductionnelles sur une protéine pourrait engendrer une conformation différente de celle-ci, ce qui aurait une incidence sur ses interactions avec d'autres protéines. De plus, la glycosylation permettrait l'existence d'une interaction de type lectinique.

De nombreuses protéines modifiées par la *O*-GlcNAc jouent un rôle essentiel dans l'organisation et l'assemblage du cytosquelette : les cytokératines (8, 13 et 18) (Chou et coll., 1992 et Ku et Omary, 1995), des neurofilaments (H, L et M) (Dong et coll., 1993), les MAP 1, 2 et 4 (microtubule associated proteins) (Ding et Vandre, 1996), la taline (Hagmann et coll., 1992), la bande 4.1 (Inaba et Maede, 1989), la crystalline (Roquemore et coll., 1992 et Roquemore et coll., 1996), la synapsine 1 (Cole et Hart, 1999), la protéine Tau (Arnold et coll., 1996), ... Toutes ces protéines *O*-GlcNAc sont connues comme étant des phosphoprotéines impliquées dans des complexes multiprotéiques dont l'assemblage ou le désassemblage est souvent dépendant de l'état de phosphorylation de ces protéines et donc peut-être de leur état de glycosylation.

Nous prendrons l'exemple de la synapsine, une protéine concentrée au niveau des terminaisons présynaptiques où elle permet l'ancrage des vésicules synaptiques au cytosquelette. Ce processus est dépendant de l'état de phosphorylation de la synapsine I, l'

une des phosphoprotéines les plus abondantes dans le cerveau. Il a été démontré que les sites phosphorylés et modifiés par la O-GlcNAc sont voisins (éloignés de 10 acides aminés) et que la glycosylation d'un site peut moduler la phosphorylation du site voisin (Cole et Hart., 1999).

3) La O-GlcNAc intervient aussi dans la transcription

La transcription des gènes est un processus extrêmement régulé d'une façon spatiale et temporelle par une relation dynamique entre l'activation de la transcription et sa répression. La liste des facteurs de transcription modifiés par la O-GlcNAc est présentée dans la tableau IX.

Tableau IX : Liste des facteurs de transcription modifiés par la O-GlcNAc (d'après Zachara et coll., 2004).

Sp1	ELF-1
AP-1 (c-fos et c-jun)	PAX-6
CTF	Enhancer factor 2D
Hepatocyte nuclear factor 1	Human C1 transcription factor
V-erbA	Oct1
Pancreas-specific transcription factor	Plakoglobin
Serum response factor (SFR)	YY1
c-myc	PDX-1
p53	CREB
h-catenin	RB
NF-κB	P107

Il est fortement probable que cette liste s'allonge avec les recherches effectuées sur cette glycosylation (Zachara et coll., 2004).

Le cas le mieux connu et le mieux étudié est celui de l'ARN polymérase II qui contient dans sa partie C-terminale un domaine contenant 52 répétitions de la séquence suivante Y-S-P-T-S-P. Ce domaine, désigné « COOH-Terminal-Domain » (CTD) permet, lorsqu'il est phosphorylé, de passer d'une phase d'initiation de la transcription à une phase d'élongation. Le CTD est glycosylé sur des sites similaires à ceux phosphorylés, la forme glycosylée n'étant

pas phosphorylée (Kelly et coll., 1993). La glycosylation permettrait de garder l'enzyme en phase d'initiation, afin de recruter les facteurs de transcription permettant ainsi le bon fonctionnement de l'ARN polymérase II (ARN pol IIA). La déglycosylation suivie d'une phosphorylation autoriserait alors son entrée en phase d'élongation (ARN pol IIO) (figure 25). Ce système O-GlcNAc/phosphorylation apporterait un niveau de régulation encore plus élaboré pour contrôler la transcription des gènes de classe II.

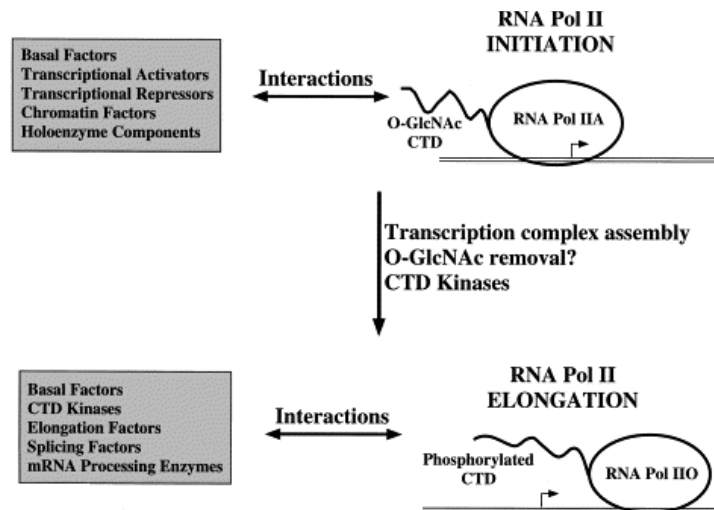


Figure 25 : L'état de modification du CTD de l'ARN polymérase II module son activité transcriptionnelle (d'après Comer et Hart, 1999).

4) La O-GlcNAc régule le cycle cellulaire

Plusieurs études ont permis de montrer le rôle de la O-GlcNAc dans la régulation du cycle cellulaire.

L'activation des lymphocytes murins par un mitogène, la concanavaleine A (Con A) s'accompagne d'une baisse des taux de O-GlcNAc au niveau des protéines cytosoliques et d'une augmentation des taux de O-GlcNAc au niveau des protéines nucléaires (Kearse et Hart, 1991).

Des expériences par micro-injection de galactosyltransférase dans des ovocytes de Xénope de stade VI ont permis de montrer l'influence de la O-GlcNAc dans la progression du cycle cellulaire. La galactosyltransférase est une enzyme qui catalyse l'addition de galactose sur des résidus de GlcNAc terminaux, empêchant la déglycosylation et la reconnaissance spécifique par des lectines. La stimulation de la maturation de ces ovocytes par la progestérone est accompagnée d'un effet toxique, phénomène lié au « capping » par le

galactose. Ce « capping » semble perturber la formation des asters durant la phase M (Fang et Miller, 2001).

Le glucose, la glucosamine et le PUGNAc (l'inhibiteur de la O-GlcNAcase) ralentissent le temps de maturation des ovocytes de stade IV. Cet effet provoqué par le glucose a pu être aboli par l'incubation simultanée de DON (6-diazonorleucine), un inhibiteur de la GFAT, l'enzyme limitante de cette voie (Slawson et coll., 2002).

L'implication directe de la voie de biosynthèse des hexosamines-6-phosphate a été démontrée par des expériences utilisant des cellules ou des embryons dont le gène codant l'autre enzyme clé de cette voie, EMeg-32, est inactivée par recombinaison homologe. *In vitro*, des cellules E différenciées, mutées au niveau du gène EMeg-32, montrent une réduction de prolifération. Enfin, des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en EMeg-32 montrent également des défauts de prolifération et une perte des capacités d'adhésion. Ces capacités peuvent être rétablies par ré-expression stable de EMeg-32 ou par la restauration nutritionnelle des niveaux intracellulaires d'UDP-GlcNAc (Boehmelt et coll., 2000).

Enfin, la progression correcte dans le cycle cellulaire et la division cellulaire sont effectivement sensibles aux variations de glycosylation puisque l'équipe de Hart a montré qu'une augmentation artificielle de la O-GlcNAc était accompagnée de « défauts de croissance », ceci étant lié au retard dans la progression G2/M, dû à une modulation de la phosphorylation mitotique et de l'expression des cyclines (Slawson et coll., 2005).

Le rôle primordial de la O-GlcNAc dans la transition G2/M a été démontré. L'alloxane bloque la transition G2/M alors que l'injection de PUGNAc accélère la maturation (Dehennaut et coll., 2007). Ces mêmes auteurs ont démontré que l'OGT était une molécule clé pour la progression du cycle cellulaire (Dehennaut et coll., 2008).

5) La O-GlcNAc : un signal de rétention nucléaire

Huit protéines du pore nucléaire sont O-GlcNAc : p45, p54, p58, p62, p100, p145, p180 et p210 (Hanover et coll., 1987 ; Holt et Hart, 1987). Les protéines p62, p58 et p54 sont nécessaires à la formation du pore nucléaire. 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 (courte séquence peptidique ou signal de rétention nucléaire permettant le transport nucléaire des protéines de masse supérieure à 40 kDa). 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 et 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 26). 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 Hsc70 (H70 kDa-Heat shock cognate protein).

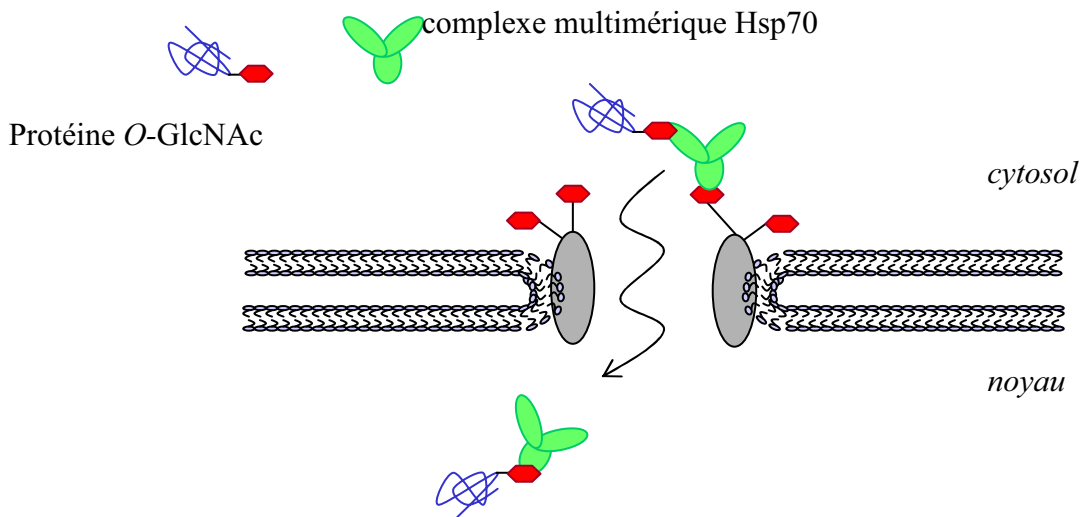


Figure 26 : Représentation schématique du transport cytosol-noyau impliquant une protéine O-GlcNAc et un complexe multimérique d'Hsp70 jouant le rôle de navette entre le cytosol et le noyau (d'après Guinez et coll., 2004).

6) La O-GlcNAc protège les protéines de la dégradation protéasomale

L'homéostasie cellulaire est assurée par un maintien correct des taux de protéines : le niveau de nombreuses protéines-clés est contrôlé par deux processus : la synthèse et la dégradation protéique. L'un des mécanismes permettant à une protéine d'être dégradée est la présence d'une région spécifique appelée PEST, région riche en résidus de proline (P), glutamine (G), sérine (S) et thréonine (T). La présence de ces régions au niveau d'une protéine permet son adressage au protéasome. Dans la majorité des cas, cette séquence PEST nécessite une activation par un mécanisme de phosphorylation. Etant donné que la O-GlcNAc jouerait un rôle antagoniste à la phosphorylation, il a été suggéré que la O-GlcNAc pourrait contrecarrer les effets de la phosphorylation au niveau des séquences PEST et ainsi empêcher la dégradation des protéines. Il est d'ailleurs intéressant de souligner que ces régions PEST sont très similaires aux sites requis pour la O-GlcNAc. En effet, cette glycosylation se fait au niveau de sites proline-sérine-sérine (PSS), proline-valine-sérine (PVS) ou de sites riches en acides aminés hydroxylés.

La régulation de la dégradation des protéines par la O-GlcNAc se fait à deux niveaux : d'une part, la glycosylation des protéines elles-mêmes augmente leur demi-vie et d'autre part la glycosylation du protéasome inhibe son activité de dégradation des protéines.

a) La glycosylation des protéines augmente leur demi-vie

Des expériences ont permis d'établir une corrélation entre l'état de glycosylation de Sp1, sa capacité de fixation à l'ADN et sa susceptibilité à être dégradé par le protéasome (Han et Kudlow, 1997).

Le cas du récepteur murin aux œstrogènes (mER- β) est similaire. Ce récepteur aux œstrogènes nucléaire est modifié à la fois par la phosphorylation et par la O-GlcNAc majoritairement sur la sérine 16 qui se trouve dans une région riche en séquences PEST (Cheng et coll., 2000). Des expériences ont permis de montrer que le « turn-over » d'un mutant contenant un résidu d'acide glutamique au niveau de la sérine 16, acide aminé mimant une phosphorylation constitutive à cet endroit, est plus rapide que la protéine sauvage. Le mutant ne possédant pas d'acide aminé hydroxylé à cet endroit est dégradé à une vitesse plus lente que la protéine sauvage, indiquant que la balance O-GlcNAc/O-phosphate au niveau du résidu de sérine 16 module la stabilité du récepteur aux oestrogènes.

La plakoglobine est une protéine qui joue un rôle capital dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Hatsell et coll., ont découvert que la plakoglobine est modifiée par la O-GlcNAc au

niveau du domaine N-terminal, et plus spécifiquement au niveau du résidu thréonine 14. Ce résidu est très proche de la « destruction box » dont la phosphorylation induit la dégradation de la protéine. La glycosylation de ce résidu de la plakoglobine est associée à une durée de vie plus longue, ce qui suggère une fois de plus l'effet antagoniste à la phosphorylation, à savoir que la *O*-GlcNAc assurerait une stabilité protéique (Hatsell et coll., 2003).

b) Le protéasome lui-même *O*-GlcNAc

Le protéasome, complexe catalytique impliqué dans la dégradation rapide des protéines intracellulaires, est également modifié et régulé par la *O*-GlcNAc.

Cinq sous-unités de la partie régulatrice du protéasome et au moins neuf sous-unités de sa partie catalytique sont modifiées par la *O*-GlcNAc (Sümegei et coll., 2003).

La relation directe entre la glycosylation du protéasome et son activité a été démontrée par les travaux de Zhang et coll. L'utilisation de peptides fluorescents ne pouvant être ni phosphorylés, ni *O*-GlcNAc, a permis de tester l'activité catalytique du protéasome en fonction de son état de glycosylation. Ces auteurs ont montré que les activités ATPasiques des sous-unités régulatrices du protéasome sont également inhibées par la *O*-GlcNAc. Enfin « l'extinction » du gène de l'OGT par la méthode d'ARN interférentiel induit une inhibition d'activité protéolytique qui peut être levée par l'ajout de la *O*-GlcNAcase (Zhang et coll., 2003).

Les niveaux de *O*-GlcNAc augmentent très rapidement et dynamiquement en réponse à différentes formes de stress (choc thermique, éthanol, UV, hypoxie et stress oxydatif et osmotique) dans une multitude de lignées cellulaires mammaliennes (Zachara et coll., 2004). L'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAc rendent les cellules plus tolérantes au stress alors qu'une diminution des taux de *O*-GlcNAc sensibilise davantage les cellules au stress. L'effet protecteur de la *O*-GlcNAc a aussi été observé sur des tissus entiers comme le cœur. Ces altérations des niveaux de *O*-GlcNAc en réponse au stress peuvent s'expliquer par l'augmentation de la recapture du glucose mais aussi par une augmentation de l'expression et de l'activité de l'OGT (Zachara et coll., 2004), par une augmentation de l'activité de la GFAT en réponse à l'augmentation des radicaux libres (Du et coll., 2000), et enfin, par l'augmentation de la production du glucose-1-phosphate et du glucose-6-phosphate due à l'activation de la glycogène phosphorylase (Gill et coll., 2002).

Ces résultats ont permis d'expliquer le rôle d'Hsp70 dans la dégradation protéasomale. Hsp70 est elle-même modifiée par la *O*-GlcNAc (Guinez et coll., 2004) et présente des

II – D. Implications de la O-GlcNAc dans les maladies humaines

1) La O-GlcNAc et les maladies neurodégénératives : le cas d'Alzheimer

La O-GlcNAc semble impliquée dans de nombreuses pathologies. Elle est abondante dans le cerveau, en particulier au niveau des protéines du cytosquelette telles que les protéines tau, le précurseur du β -amyloïde, les neurofilaments, les protéines associées aux microtubules, les protéines d'assemblage de la clathrine (AP3 et AP180), la synapsine I, CRMP-2 (collapsin response mediator protein-2), UCH-L1 (ubiquitin carboxyl hydrolase-L1) et la β synucléine (Arnold et coll., 1996 ; Griffith et coll., 1995 ; Dong et coll., 1993 ; Ding et coll., 1996 ; Murphy et coll., 1994 ; Yao et coll., 1998 ; Cole et coll., 1999 ; Cole et coll., 2001). Une perturbation de cette glycosylation peut contribuer à certains désordres neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer. Le processus neurodégénératif de la maladie serait dû à deux types de lésions, les plaques séniles ou plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. L'état de glycosylation de la protéine APP (Amyloid Protein Precursor) pourrait affecter sa dégradation et être à l'origine des plaques séniles (Griffith et coll., 1995).

L'état de phosphorylation des protéines Tau est également impliqué dans le développement de la maladie d'Alzheimer, une hyperphosphorylation étant observée chez les patients atteints par la pathologie. La phosphorylation de Tau pourrait être modulée par l'état d'O-GlcNAcylation de la protéine. Ainsi une augmentation de la phosphorylation de Tau est corrélée à une diminution de son niveau de O-GlcNAc après un traitement par l'acide okadaïque, un inhibiteur des phosphatases 1 et 2A (Lefebvre et coll., 1999 ; Lefebvre et coll., 2003). L'hyperphosphorylation de Tau induite par le jeun chez la souris est réversée lorsque les souris ont accès à la nourriture (Li et coll., 2006). La O-GlcNAcylation régule négativement la phosphorylation de Tau (Liu et coll., 2004). Des résultats similaires sont observés suite à une surexpression de l'OGT (Robertson et coll., 2004).

L'hyperphosphorylation anormale de Tau observée dans le cerveau de patients atteint de la maladie d'Alzheimer pourrait donc s'expliquer par une diminution du métabolisme glucidique qui causerait une réduction graduelle des niveaux de l'UDP-GlcNAc et donc de la O-GlcNAcylation des protéines Tau. Cette régulation négative de la O-GlcNAc permettrait une hyperphosphorylation de Tau. Il faut noter que globalement la O-GlcNAc tend à diminuer d'environ 22 % chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer par rapport aux cerveaux sains (Liu et coll., 2004).

Dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer, les neurofilaments sont hyperphosphorylés (Perry et coll., 1985 ; Sternberger et coll., 1985 ; Lee et coll., 1988 et Wang et coll., 2001) et s'accumulent pour provoquer une dégénérescence rétrograde des neurones. Comme pour la protéine Tau, l'hyperphosphorylation des neurofilaments pourrait s'expliquer par une diminution du métabolisme glucidique qui induirait une diminution de la O-GlcNAcylation de NF-M et une hyperphosphorylation de NF-M et donc des neurofilaments (Deng et coll., 2008).

La perte des synapses est une autre neuropathologie de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs études suggèrent que la O-GlcNAc pourrait être impliquée dans cette perte synaptique (Yao et coll., 1998). Ainsi la synapsine I qui appartient à une famille de cinq phosphoprotéines (synapsines) associées aux membranes des vésicules synaptiques et qui sont impliquées dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs (Ferreira et coll., 2002) est aussi hautement GlcNAcylée au niveau de sites d'interactions avec les vésicules synaptiques (Cole et Hart, 1999) et pourrait donc être impliquée dans la perte synaptique observée dans la maladie d'Alzheimer.

2) La O-GlcNAc et le diabète de type II

a) Rappel sur la signalisation de l'insuline

L'inefficacité de l'insuline à normaliser la glycémie, appelée résistance à l'insuline, serait une condition préalable au développement du diabète de type 2 (insulino-indépendant). Cette situation entraîne une hyperinsulinémie compensatoire qui persiste jusqu'au moment où les cellules β du pancréas ne peuvent plus sécréter suffisamment d'insuline pour promouvoir le retour à une glycémie normale menant au premier symptôme clinique du diabète.

b) La O-GlcNAc et le diabète

Plusieurs groupes ont montré à partir de cultures cellulaires, mais aussi chez des modèles animaux et des patients atteints du diabète de type II, que l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induisent une élévation des taux d'UDP-GlcNAc (Robinson et coll., 1995 ; Yki-Jarvinen et coll., 1996 ; Yki-Jarvinen et coll., 1997 ; McClain et coll., 2002) et que l'excès du flux de glucose à travers la voie des HBP aboutit au développement de la résistance

à l'insuline (Buse et coll., 2006). Les niveaux en UDP-GlcNAc dépendent du flux de glucose entrant dans la voie de biosynthèse des hexosamines-6-phosphate. C'est pourquoi l'UDP-GlcNAc peut servir de « détecteur de glucose » autrement dit c'est un composé de haute-énergie dont la synthèse est requise pour répondre au glucose, aux acides aminés, aux acides gras et au métabolisme des nucléotides. Ainsi un rôle de la voie des HBP dans le processus de résistance à l'insuline était à suspecter.

Pour le démontrer, certains auteurs ont utilisé la glucosamine qui, perfusée *in vivo*, reproduit l'hyperglycémie. Ceci entraîne la résistance à l'insuline dans les adipocytes de rats (Marshall et coll., 1991) et dans les muscles squelettiques (Virkamaki et coll., 1997 ; Virkamaki et coll., 1999 ; Patti et coll., 1999). Les effets de la glucosamine mettent en jeu une déplétion en ATP (Hresko et coll., 1998).

Plusieurs études ont clairement établi que la conversion du glucose en glucosamine, qui est catalysée par la GFAT, est essentielle pour le développement de la résistance à l'insuline. Par exemple, des souris transgéniques surexprimant la GFAT dans les muscles squelettiques et les adipocytes développent une résistance à l'insuline et une hyperléptinémie (Coosksey et coll., 2002 ; Hebert et coll., 1996). De plus, la surexpression de la GFAT dans les cellules β de souris aboutit aussi à une hyperinsulinémie et une résistance à l'insuline, ce qui signifie que la voie des HBP est impliquée dans la régulation de l'insuline dans le pancréas (Tang et coll., 2000).

In vitro et *in vivo*, il a été en effet montré que l'augmentation du flux à travers la voie des hexosamines-6-phosphate conduit à une augmentation de la concentration en UDP-GlcNAc qui élève les taux de O-GlcNAc et permet le développement d'une résistance à l'insuline (Buse et coll., 2002 ; McClain et coll., 2002). Cette élévation du taux de O-GlcNAc est observée sur les protéines du muscle squelettique (Yki-Jarvinen et coll., 1998) comme dans les cellules β pancréatiques (Liu et coll., 2000). La résistance à l'insuline est aussi observée chez des souris où l'OGT est surexprimée dans les cellules musculaires et adipocytaires (McClain et coll., 2002). Enfin, le PUGNAc, inhibiteur de la O-GlcNAcase, entraîne une résistance à l'insuline dans les adipocytes 3T3-L1 en diminuant la phosphorylation d'Akt sur la thréonine 308 et celle de la GSK3 β sur la sérine 9 alors que la O-GlcNAcylation augmente sur IRS-1 et la β -caténine (Vosseler et coll., 2002). Des études similaires sur des adipocytes primaires de rats montrent aussi que le PUGNAc augmente la GlcNAcylation d'Akt2 et d'IRS-1, alors que leur phosphorylation diminue (Park et coll., 2005). Récemment, un site majeur de O-GlcNAc a d'ailleurs été identifié sur IRS-1 (Ball et

coll., 2006). Ces résultats montrent donc un lien direct entre l'élévation des taux de *O*-GlcNAc et le développement de la résistance à l'insuline.

Akimoto et coll., ont montré que chez des rats Goto-Kakizaki (rats diabétiques de type 2 non insulino-dépendant), le PUGNAc induisait une augmentation du taux de *O*-GlcNAc et une diminution de la sécrétion d'insuline dans les cellules β du pancréas (Akimoto et coll., 2007 ; Park et coll., 2007).

III – La phosphorylation.

III – A. Introduction

La modification post-traductionnelle la plus connue à ce jour dans le muscle squelettique est la phosphorylation. Cette phosphorylation affecte de nombreuses protéines contractiles comme les MHC mais plus particulièrement les protéines régulatrices telles que la TnT, la tropomyosine et les MLC. C'est la phosphorylation de la MLC₂ qui a été la plus étudiée jusqu'à présent de part ses profondes répercussions sur les propriétés contractiles du muscle. La phosphorylation de la MLC₂ sur des sites spécifiques a été pour la première fois décrite par Perrie et coll. en 1973. Jusqu'à présent dans le muscle squelettique, un seul site de phosphorylation a été identifié sur la MLC₂. Il s'agit de la sérine 14 pour l'isoforme lente, la MLC_{2s} et la sérine 15 pour l'isoforme rapide, la MLC_{2f} (Blumenthal et Stull, 1980). Dans le muscle lisse, outre un premier site de phosphorylation situé en sérine 19, un second site a été identifié sur la MLC₂, en sérine 12 ou en thréonine 9 (Ikebe et Hartshorne, 1985). Le premier site serait phosphorylable par une Ca²⁺/calmoduline MLC kinase dépendante ainsi que par une Rho-kinase (Ikebe et Hartshorne, 1985) et activerait l'interaction actine-myosine. Le second site serait lui sous l'action de la PKC (Protéine Kinase C) et sa phosphorylation aurait un effet inhibiteur (Ikebe et coll., 1985 ; Ikebe et Reardon, 1990a ; Ikebe et Reardon, 1990b). L'existence d'un second site de phosphorylation pour la MLC₂ squelettique est pour l'instant sujet à discussion (Morano et coll., 1989 ; Gonzalez et coll., 2002).

III – B. Mécanismes moléculaires impliqués dans la phosphorylation de la MLC₂.

La phosphorylation de la MLC₂ est nécessaire et indispensable à l'initiation de la contraction dans le muscle lisse (rôle régulateur) (Kamm et Stull., 1985), alors qu'elle ne régule que certains aspects de la contraction du muscle squelettique (rôle modulateur) (Sweeney et coll., 1993).

Le niveau de phosphorylation de la MLC₂ est régulé par l'activité de deux enzymes : la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) et la MP (Myosin Phosphatase).

1) La MLCK (Myosin Light Chain kinase)

Les MLCK ont été purifiées à partir de différents tissus dont les muscles squelettiques (Pires et Perry, 1977; Blumenthal et Stull, 1980; Adelstein et Klee, 1981), les muscles lisses (Adelstein et Klee, 1981 ; Miller et coll., 1983) et le muscle cardiaque (Walsh et coll., 1979 ; Wolf et Hofmann, 1980). La MLCK squelettique (MLCKsk) est exprimée plus fortement dans le muscle rapide que dans le muscle lent. Au contraire, la MLCK des muscles lisses a une distribution ubiquitaire avec une expression plus grande dans le muscle lisse (Zhi et coll., 2005).

Le décodage de l'ADNc de la MLCK chez le rat (Roush et coll., 1988) a permis de démontrer que la MLCK présente 2823 acides aminés, avec une séquence de lecture ouverte de 1830 acides aminés. Une analogie de 96 % dans la région C-terminale (région catalytique et site de liaison à la calmoduline) existe entre la MLCK de rat (Roush et coll., 1988) et celle du lapin (Pires et Perry, 1977). Elle n'est transcrite que par un seul et unique ARN dans le muscle squelettique.

Malgré les similitudes existant entre les différentes MLCK retrouvées dans les tissus musculaires et non musculaires, leur poids moléculaire (PM) est variable. Les MLCK extraites du muscle lisse présentent ainsi un PM d'environ 130-150 kDa, alors que ceux des MLCK des muscle striés cardiaques et squelettiques sont d'environ 75-95 kDa (Pires et Perry, 1977 ; Wolf et Hofmann, 1980 ; Adelstein et Klee, 1981). L'existence d'isozymes de MLCK tissu- et espèce-spécifiques a également été démontrée (Stull et coll., 1985).

La MLCK présente la particularité d'être spécifique de son substrat. Elle phosphoryle uniquement les RLC (Stull et coll., 1985). Liée sous forme de complexe à la calmoduline dans son état de repos, la MLCK s'active suite à la liaison du calcium sur les 4 sites EF-hand de la calmoduline (Blumenthal et Stull, 1980 ; Stull et coll., 1985). Dans le muscle squelettique, l'étude de l'expression de l'ARN de la MLCK a démontré qu'il était exprimé de façon différente dans les muscles lents ou rapides, l'activité enzymatique étant généralement corrélée à l'expression de la MLCK. Il a été observé qu'un muscle « rapide-glycolytique » comme le gastrocnemius blanc présente une activité de phosphorylation fortement supérieure à celle des muscles lents. Ainsi, le gastrocnemius rouge (muscle « rapide-glycolytique ») et le soleus (muscle « lent-oxydatif ») possèdent respectivement 60 et 13 % de l'activité enzymatique observable dans le gastrocnemius blanc (Roush et coll., 1988).

Enfin, il a été décrit par Gao et coll. que la MLCK s'autophosphoryle en sérine 161 lors de la contraction, ce qui aurait sur celle-ci un effet autoinhibiteur (Gao et coll., 1992).

2) La MP (Myosin Phosphatase)

La MP est une enzyme composée de deux sous-unités, catalytique et régulatrice. La sous-unité catalytique est identifiée comme la Protéine Phosphatase 1 (PP1) de 37 kDa. Cette sous-unité fait partie de la grande famille des PP1, phosphatases sérine/thréonine. Dans le muscle squelettique, la PP1 a été identifiée comme les isoformes PP1 β ou PP1 δ qui sont en fait une seule et même protéine (Dent et coll., 1992 ; Cohen, 2002). La PP1 déphosphoryle une multitude de protéines. La spécificité de déphosphorylation est donnée par la seconde sous-unité régulatrice : dans le muscle il s'agit de la sous-unité MYPT (Myosin Phosphatase Target). D'après des études menées dans le muscle lisse (Cohen, 2002), celle-ci interagit avec un site hydrophobe de la PP1, par l'intermédiaire de motif RVxF. Trois isoformes de MYPT sont actuellement connues (Cohen, 2002). La sous-unité spécifique du muscle squelettique est la MYPT2 (Damer et coll., 1998 ; Fujioka et coll., 1998 ; Moorhead et coll., 1998). C'est une protéine de 110 kDa qui présente une homologie de 61 % avec la phosphatase connue dans le muscle lisse (Moorhead et coll., 1998). En effet, MYPT a été étudiée essentiellement dans le muscle lisse (MYPT1). Dans son domaine N-terminal, elle lie la PP1 catalytique. Dans son domaine C-terminal, elle renferme des sites de liaison pour les phospholipides (Ito et coll., 1997). A l'heure actuelle, ces propriétés ne sont pas décrites dans le muscle squelettique. L'homologie à seulement 48 % dans leur domaine C-terminal entre MYPT1 et MYPT2 laisse penser que la possibilité d'une telle gamme d'interactions reste hypothétique.

III – C. Effets de la phosphorylation de la MLC₂ sur la potentialisation de la force de contraction du muscle strié squelettique

1) Mise en évidence

La MLC_{2sk} est phosphorylée après une brève stimulation tétanique (Manning et coll., 1979) ou en réponse à des trains de stimulations à basse fréquence (5–10 Hz) (Klug et coll., 1982 ; Moore et coll., 1984). Le niveau de phosphorylation de la MLC₂ est dépendant du temps et de la fréquence de stimulation. La phosphorylation de la MLC₂ induit une potentialisation de la force. In vitro, sur fibres squelettiques perméabilisées, le niveau isométrique de redéveloppement de la force (Metzger et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1990b) et la force isométrique sous-maximale (développée à des niveaux d'activation calcique ne permettant pas une contraction totale) (Persechini et coll., 1985) augmentent avec la

phosphorylation de la MLC_2 . Cependant, il n'y a pas d'effet sur la force isométrique maximale (Godt et coll., 1989). Szczesna et coll., (1996a) montrent que l'extraction de la MLC_2 de la myosine diminue le niveau isométrique de redéveloppement de la force et que ce dernier augmente de 20 % lorsque la MLC_2 est réincorporée. Ils démontrent également que la réincorporation de la MLC_2 augmente la force isométrique. Sweeney et Stull., (1990b) ont démontré que la phosphorylation de la MLC_2 exerce ses effets sur la génération de la force et sur le niveau isométrique de redéveloppement de la force dans le muscle strié en augmentant le niveau constant décrivant la transition « pas de force générée » à « force générée » (f_{app}). La magnitude de la potentialisation de la contraction est proportionnelle au niveau de phosphorylation de la MLC_2 (Moore et coll., 1984). Cette potentialisation se produit pour les fibres de types IIB (Ryder et coll., 2007). Les fibres de type IIA contiennent moins de MLCKsk, la MLC_2 est donc moins phosphorylée après une stimulation électrique (Zhi et coll., 2005).

La potentialisation se caractérise par un shift à gauche de la relation Tension/pCa (c'est-à-dire par une augmentation de la sensibilité calcique de l'appareil contractile) et par une diminution de la coopérativité des protéines contractiles du filament fin (Sweeney et coll., 1986). Szczesna et coll. confirment ces résultats et montrent que le niveau endogène de la phosphorylation de la MLC_2 est en effet déterminant pour la sensibilité calcique du développement de la force (Szczesna et coll., 2002). En utilisant de la myosine squelettique reconstituée avec des RLC phosphorylées, ils démontrent aussi que la phosphorylation de la MLC_2 augmente la sensibilité calcique de l'activité ATPasique du filament fin d'actine.

Cette potentialisation s'observe seulement dans le muscle squelettique rapide comme l'EDL (Manning et coll., 1979 ; Klug et coll., 1982 ; Manning et coll., 1982 ; Moore et coll., 1984 ; Houston et coll., 1985 ; Moore et coll., 1985). Le manque de potentialisation significative dans le soleus peut s'expliquer en partie par le fait que dans ce muscle l'activité de la phosphatase est plus grande que celle de la kinase. Par ailleurs, l'espace interfilaire entre le filament épais de myosine et le filament fin d'actine pourrait être suffisamment petit pour un développement optimal de la force même si la MLC_2 n'est pas phosphorylée. L'interaction de la MLC_2 avec la MHC peut également être différente d'une isoforme de myosine à une autre ce qui pourrait affecter les déplacements de la tête de myosine. Aussi il pourrait y avoir d'autres différences intrinsèques aux types de fibres musculaires.

Zhi et coll. ont montré que les stimulations électriques n'ont plus d'effet sur la phosphorylation de la MLC_2 dans l'EDL de souris n'exprimant pas la MLCKsk (Zhi et coll.,

2005). Cette perte de la phosphorylation de la MLC_2 est accompagnée d'une chute de la potentialisation de la force après une brève stimulation tétanique ou des trains de stimulations à basse fréquence. De plus, Ryder et coll. démontrent aussi que la surexpression de la MLCK augmente le niveau de phosphorylation de la MLC_{2f} et de la MLC_{2s} et ils confirment que cette phosphorylation accroît la potentialisation de la force uniquement dans l'EDL sur les fibres de types IIb (Ryder et coll., 2007). Ces résultats ne sont pas corrélés à une up-régulation de la calmoduline. Ils confirment ainsi que la phosphorylation de la MLC_2 médiée par la MLCK est fortement impliquée dans la potentialisation de la force et que les niveaux de la MLCK sont limitants pour la phosphorylation de la MLC_2 dans les muscles squelettiques rapide et lent.

La phosphorylation de la MLC_2 agit dans les muscles striés squelettiques comme un facteur qui accroît la performance musculaire, une sorte de mémoire que le muscle a récemment été activé (Sweeney et coll., 1993). La phosphorylation de la MLC_2 accroît la force si le muscle a été précédemment activé et permet à la force d'être maintenue à un certain niveau si, durant des contractions prolongées, la concentration en calcium diminue.

Les effets de la phosphorylation de la MLC_2 sur la performance du muscle squelettique de l'Homme durant la fatigue musculaire a été également investie par Houston et ses collaborateurs (Houston et coll., 1987 ; Houston et coll., 1990 ; Grange et coll., 1991 ; Vandenboom et coll., 1993). Ces derniers montrent que la phosphorylation de la MLC_2 favorise la performance musculaire sous des conditions d'activation sous-maximale durant la fatigue.

2) Le mécanisme de la phosphorylation

Chez le muscle strié mammalien, où la phosphorylation a un rôle modulateur, les têtes de myosines avec la MLC_2 non phosphorylée sont associées au squelette du filament épais. Lorsque la MLC_2 devient phosphorylée, les têtes de myosines s'éloignent du filament épais pour se rapprocher du filament fin d'actine (Sweeney et coll., 1993). Ce changement de position augmente le nombre de têtes de myosines qui peuvent s'attacher à l'actine (figure 28). Cette hypothèse explique l'augmentation de la force isométrique et du niveau isométrique de redéveloppement de la force observée lorsque la MLC_2 est phosphorylée (Sweeney et coll., 1986). Le changement d'espace entre les filaments fin et épais ou le changement de longueur du sarcomère amènent les têtes de myosines à proximité de l'actine, mimant ainsi l'effet de la phosphorylation de la MLC_2 (Yang et coll., 1998).

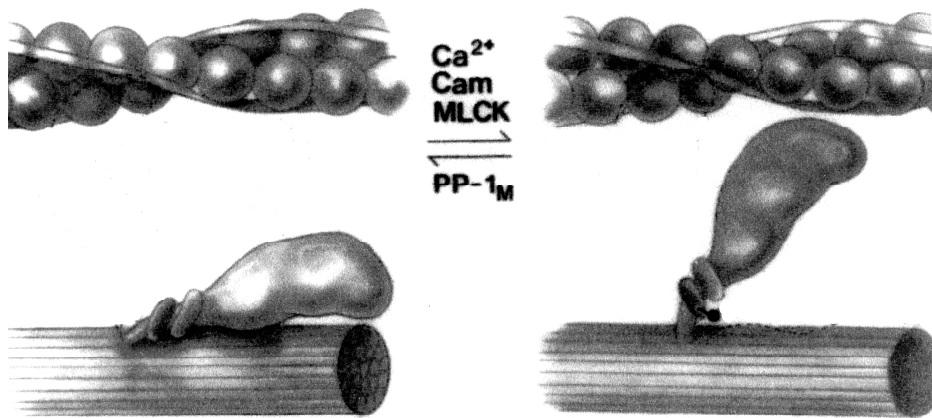


Figure 28 : Représentation schématique de l'effet de la phosphorylation de la MLC₂ sur le positionnement des têtes de myosine par rapport au filament fin d'actine. Position des têtes de myosine avant phosphorylation (à gauche) et après phosphorylation de la MLC₂ (à droite) (d'après Sweeney et coll., 1993).

Par ailleurs, il a été démontré que dans le muscle squelettique, le filament épais est plus ordonné pour des températures élevées, ce qui suggère que les têtes de myosines s'éloignent du squelette du filament épais quand la température diminue (Lowy et coll., 1991). Cet effet de la température sur la structure du filament épais pourrait expliquer pourquoi l'effet de la phosphorylation diminue avec la diminution de la température.

III – D. La phosphorylation et la commande nerveuse

Un autre effet possible de la phosphorylation serait détectable à long terme. Il serait fondé sur une relation entre la commande nerveuse et la régulation de la phosphorylation de la MLC₂. En effet, des muscles de souris atteints de myotonie (présentant des potentiels d'action indépendants d'une stimulation électrique) ont un niveau de phosphorylation de la MLC₂ supérieur à celui de muscles contrôles (Jockusch et coll., 1988 ; Tubman et coll., 1996). Par contre, des muscles dont le message nerveux est inhibé par la TTX ont un niveau de phosphorylation inférieur à celui de muscles contrôles (Tubman et coll., 1996). D'autres études démontrent qu'il existe des niveaux hétérogènes de phosphorylation de la MLC₂ suite à des traitements modifiant le message nerveux (Germinario et coll., 2002 ; Gonzalez et coll., 2002). Un exemple flagrant est la diminution du niveau de phosphorylation du cœur de

Hamster par un facteur 2.5 durant sa période d'hibernation (diminution des battements cardiaques) (Morano et coll., 1992).

III – E. La phosphorylation et la plasticité neuromusculaire

L'état de phosphorylation de la MLC_2 est soumis à une forte plasticité. Ainsi non seulement, on observe un changement d'expression de la MLC_2 dans le muscle soleus dans le modèle d'atrophie fonctionnelle de HH chez le rat avec une augmentation de l'expression de la MLC_{2f} au dépend de la MLC_{2s} , mais ce changement d'expression est associé à une augmentation de la phosphorylation de la MLC_{2s} comme de la MLC_{2f} . Après avoir identifié les différentes isoformes de la MLC_2 par électrophorèse bidimensionnelle (2D), nous avons démontré au laboratoire que le polymorphisme des MLC_2 était principalement dû à différents états de phosphorylation (Bozzo et coll., 2003). Plusieurs isoformes de MLC_2 ont été caractérisées dans le soleus contrôle : l'isoforme lente MLC_{2s} (92 %), prédominante par rapport à la MLC_{2f} , apparaît sous la forme de trois spots 2s (73 %), 2s1 (26 %) et 2s2 (1 %). 2s et 2s2 correspondent, respectivement, à des formes non phosphorylées et phosphorylées de la MLC_2 . Le spot intermédiaire 2s1 ne serait qu'en partie phosphorylable. Dans l'EDL, à côté de l'isoforme rapide MLC_{2f} (prédominante), un deuxième spot 2f1 est détecté. Les résultats obtenus après HH montrent une redistribution importante des isoformes lentes de MLC_2 avec une augmentation des états phosphorylés. En outre, l'HH induit dans le soleus une transformation dans le sens lent vers rapide : augmentation des MLC_2 rapides (2f, 70 %), et de la forme phosphorylée de la MLC_{2f} , 2f1 (30 %) (Bozzo et coll., 2003). Aucune modification n'est observée dans l'EDL après HH (Bozzo et coll., 2003). Il est connu que le pattern d'activité nerveuse d'un muscle postural lent comme le soleus est fortement modifié pour se transformer en un pattern se rapprochant de celui d'un muscle rapide lors d'une période de HH. Le pattern d'un muscle rapide, plus impliqué dans le mouvement comme l'EDL, n'est lui, pas modifié en HH. Ces résultats suggèrent donc que la commande nerveuse va être à l'origine des modifications du degré de phosphorylation de la MLC_2 .

L'analyse de ce phénomène a été faite sur un modèle de dénervation de la patte postérieure. Ce modèle permet de supprimer la commande nerveuse du muscle, et donc d'obtenir des effets plus marquées que l'HH au niveau du soleus. Au niveau de l'EDL, dont le message nerveux n'est pas modifié après HH, la dénervation permet d'observer les effets d'une absence de commande nerveuse sur le niveau de phosphorylation de la MLC_2 . Par

ailleurs, ce modèle permet de transformer le soleus en un muscle plus rapide, conservant ainsi une transition phénotypique comparable à celle rencontrée en HH. Pour l'EDL, la dénervation est connue pour transformer le muscle en un muscle plus lent, et donc permet d'obtenir une première approche des variations de phosphorylation de la MLC₂ dans le cas d'une transition phénotypique inverse rapide vers lent. La dénervation montre d'une part, que dans le soleus, la transition lent vers rapide est accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation des isoformes lente et rapide de MLC₂. Ces résultats confirment que l'augmentation de la phosphorylation de la MLC₂ est directement reliée à une transition phénotypique. Ce modèle montre d'autre part, qu'une transition inverse rapide vers lent, dans le cas de l'EDL dénervé, est associée à une diminution de la phosphorylation de la MLC₂. Ces résultats indiquent donc que le message nerveux est de haute importance dans la régulation de la phosphorylation de la MLC₂. Il est connu maintenant que l'identité du message nerveux (type lent ou type rapide) rend active (muscle lent) ou inactive (muscle rapide) la calcineurine, qui, par l'intermédiaire du NFAT, régule des gènes typiques du phénotype lent, et l'inhibition de certains gènes rapides (Schiaffino et Serrano, 1998). Sur ces bases, une étude a été réalisée sur des muscles présentant une commande nerveuse altérée, le soleus et l'EDL dénervés, en étudiant les effets d'un inhibiteur de la calcineurine, la cyclosporine A (CsA) sur deux paramètres : le phénotype musculaire et la phosphorylation de la MLC₂. Cette étude a permis de (1) de vérifier l'hypothèse d'une régulation de la phosphorylation de la MLC₂ par un facteur de nature nerveuse. En occasionnant une transformation phénotypique d'un muscle lent par modification du message nerveux (dénervation), il est possible de faire varier l'état de phosphorylation, alors qu'un modèle (injection de CsA) inhibant non pas la commande nerveuse mais une molécule médiatrice du message nerveux (la CaN) ne modifie pas le niveau de phosphorylation de la MLC₂ et (2) montrer que, si le message nerveux est de haute importance dans la régulation de la phosphorylation de la MLC₂, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas exclusivement CaN/NFAT-dépendants.

L'analyse de la corrélation entre la phosphorylation de la MLC₂ et les transformations phénotypiques a été poursuivie sur d'autres modèles animaux dans des conditions d'hypergravité (HG) permettant une transition lent vers rapide du soleus, dans un modèle d'électrostimulation chez le rat où les EDL sont stimulés par CLFS (Chronic Low Frequency Stimulation) permettant une transition rapide vers lent. Les auteurs ont montré que le soleus d'un rat conçu, né et élevé en HG n'exprime plus que des isoformes lentes (MHCI seule). Malgré l'existence de ces profondes transformations phénotypiques, il n'est pas apparu de variation des états de phosphorylation de la MLC₂ du soleus CBR (Bozzo et coll., 2004). Par

contre, la transformation phénotypique de l'EDL rapide vers lent est associée à une diminution de la phosphorylation de la MLC₂.

Ces travaux démontrent que la phosphorylation de la MLC₂ est reliée de façon étroite aux changements phénotypiques musculaires, avec une diminution de phosphorylation lors d'une transition rapide vers lent, et une augmentation lors d'une transition lent vers rapide. L'augmentation de la phosphorylation de la MLC₂ est associée à une augmentation de la MLCK et de son transcrit et à une diminution de l'expression de l'ARNm de MYPT2. Lorsque le degré de phosphorylation de la MLC₂ diminue, l'expression de la MLCK diminue. Les variations du niveau de phosphorylation de la MLC₂ résultent directement de la balance dans l'expression du duo MLCK/MP (Bozzo et coll., 2004) :

- Une augmentation de phosphorylation serait due à une augmentation de l'expression de MLCK et à une diminution de l'expression de MP,
- Une diminution de phosphorylation serait due à une diminution de l'expression de MLCK et à une augmentation probable de la MP (non démontré),
- Les variations du niveau d'expression de la MP sont dépendantes de l'expression de sa sous-unité MYPT2, qui donne sa spécificité tissulaire à la MP, alors que sa sous-unité catalytique PP1, non spécifique, reste à un niveau basal quel que soit le changement phénotypique du muscle.

Chapitre III

Matériels et Méthodes

I. Matériel biologique

Deux modèles ont été retenus dans le cadre de ce présent travail : l'Homme et le rat.

I – A. L'Homme

En réponse à un appel d'offre 2005 de l'ESA (Agence Spatiale Européenne), notre laboratoire a monté un projet concernant l'étude de la structure et de la fonction des protéines contractiles lors d'une période d'inactivité musculaire portant sur des femmes. Des experts externes, européens et américains, ont examiné l'ensemble des protocoles scientifiques et le comité d'éthique français a approuvé la conception intégrée de l'étude WISE. Notre projet a bénéficié de la meilleure évaluation et les Prs Y. Mounier et L. Stevens se sont vus attribuer la coordination des cinq équipes internationales également sélectionnées pour cette étude. L'expérience bed-rest est le fruit d'une coopération entre l'Agence Spatiale Européenne (ESA), le Centre National d'Études Spatiales (CNES), l'Administration Nationale américaine de l'Aéronautique et de l'Espace (NASA) et l'Agence Spatiale Canadienne (CSA). Elle a été réalisée en France, à la Clinique Spatiale MEDES (Institut français de Médecine et de Physiologie Spatiales) située sur le site de l'hôpital de Rangueil à Toulouse. Jusqu'en janvier 2005, plus de 1600 femmes ont répondu à l'appel à candidatures de l'ESA. Comme prévu, 24 femmes ont finalement été sélectionnées. Ces femmes sont originaires de France, du Royaume-Uni, de l'Allemagne, de Finlande, des Pays-Bas, de Pologne et de République Tchèque, ce qui témoigne de l'intérêt important suscité par l'étude dans les nouveaux pays membres de l'Union Européenne.

Ces vingt-quatre femmes sont restées pendant 60 jours allongées (bed-rest), la tête légèrement inclinée vers le bas (-6°) pour simuler les effets physiologiques d'un séjour prolongé en apesanteur. Les volontaires sont divisées en trois groupes. Le premier groupe, noté BR, correspond à 8 femmes qui ont subi simplement la campagne d'immobilisation et servent de groupe test pour les autres groupes expérimentaux. Le second groupe, BR+EXO, correspond à 8 femmes qui exécutent différents exercices au cours de leur immobilisation. Le troisième groupe, BR+NUT, représente 8 femmes qui reçoivent un complément d'acides aminés lors des repas. Ce dernier groupe ne sera pas examiné dans notre étude.

Pour le groupe BR+EXO, deux types d'exercices sont combinés pendant le bed-rest : des exercices résistifs et aérobiques. Les exercices de résistance seuls permettent de préserver les caractéristiques contractiles des fibres rapides sans être bénéfiques pour les fibres lentes

(Trappe, 2004), c'est pourquoi des exercices aérobiques sont ajoutés à l'entraînement. Le but était de mieux protéger l'ensemble des fibres lentes et rapides des muscles durant une période prolongée d'alitement.

Avant le bed-rest, les sujets sont entraînés pour être familiarisés avec les différents protocoles et pour établir leurs données physiologiques de base. Ensuite, les exercices sont pratiqués deux à trois fois par semaine pendant les 60 jours du bed-rest. Les exercices comportent :

- Des exercices résistifs. Le groupe BR+EXO a effectué des exercices entraînant les muscles de la cuisse et du mollet. Les exercices sont réalisés en position allongée en utilisant un ergomètre de type « flywheel » c'est-à-dire à pédalage (utilisé au cours des vols spatiaux), adapté pour que les sujets restent en position « HDT=Head down tilt » (inclinaison de l'axe du corps de 6° par rapport aux pieds).
- Des exercices aérobiques : deux ou trois fois par semaine, les sujets réalisent 40 minutes d'exercices aérobiques. Le tapis roulant utilisé pour ces exercices est classique (Cao et coll., 2005) et le protocole consiste en sessions d'exercices d'intensités différentes, choisies en fonction des données de base établies pour chaque sujet (critère de relation linéaire entre la vitesse du tapis roulant et la VO₂ des sujets mesurée en position verticale avant le bed-rest).

I – B. Rats (Souche Wistar)

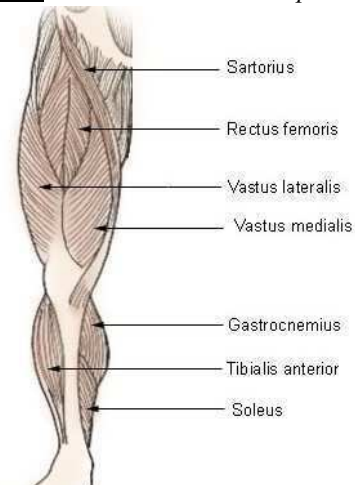
Ce sont des rats mâles adultes de souche Wistar pesant entre 260 et 300 g qui sont utilisés. Dans le cadre de ce présent travail, seuls des rats contrôles ont été utilisés.

I – C. Les muscles étudiés

- Chez l'**Homme**, le vastus lateralis (VL) et le soleus ont été étudiés.

Le vastus lateralis (VL) ou vastus externus est la plus grande partie du quadriceps femoris, grande masse musculaire qui couvre le devant de la cuisse et les côtés du fémur et qui est composée de quatre muscles

Figure 29 : Anatomie du membre postérieur.



extenseurs du genou dont fait partie le VL. Celui-ci est localisé sur le côté latéral du fémur. Ces muscles jouent un rôle crucial dans la marche, la course et le saut. Le VL est un muscle mixte rapide.

Le soleus est le muscle extenseur de la cheville ; c'est un muscle postural de type lent, composé majoritairement de fibres lentes de type I. Ce muscle est particulièrement affecté lors d'une atrophie résultant d'une non-utilisation des membres postérieurs.

➤ Chez **le rat**, l'étude porte sur le soleus et l'EDL (extenseur digitorum longus). Ce dernier est un muscle fléchisseur de la cheville. C'est un muscle de type rapide, composé principalement de fibres rapides de type II. Ce muscle est peu sensible à l'atrophie fonctionnelle.

Les compositions en différents types de fibres de ces muscles ont été détaillées dans le chapitre II, A, IV.

I – D. Protocole de prélèvements

Les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (3mg.kg⁻¹).

Chez l'Homme, les biopsies sont prélevées par un médecin à l'aiguille sous anesthésie locale avant et après la période d'immobilisation.

Les biopsies sont soit immédiatement congelées dans l'azote liquide puis pulvérisées et conservées à -80°C avant utilisation soit découpées en faisceaux selon l'orientation longitudinale des fibres, et soumises au protocole de pelage (chapitre III, II-A).

II. Détermination des relations Tension/pCa (T/pCa)

II – A. Protocole de pelage

Une fois prélevées, les biopsies (humaines et de rats) utilisées pour l'établissement des propriétés contractiles, sont soumises au protocole de pelage. Le « pelage » d'une fibre musculaire isolée permet d'avoir accès aux protéines contractiles, motrices et régulatrices. Il implique donc de rendre perméable le sarcolemme qui maintient une cohésion forte entre les fibres. Cette technique présente deux intérêts majeurs : elle permet, d'une part, de s'affranchir

de la commande motrice (la contraction musculaire se faisant in vitro par application externe de calcium), et d'autre part, de pouvoir analyser le contenu en protéines contractiles d'une cellule unique. Dans ce présent travail, nous utilisons le pelage chimique qui consiste à perméabiliser les membranes par application d'éthylène glycol-bis (2-amino-ethylether)-N, N, N', N'-tetra-acetic acid (EGTA). En chélatant le Ca^{2+} , ce composé déstructure les membranes sarcolemmiques et le système tubulaire transverse sans altérer les protéines contractiles sous-jacentes (Eastwood et coll., 1979), 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 peler simultanément l'ensemble des fibres, et d'isoler, de façon aisée, une seule fibre.

Les biopsies fraîchement prélevées sont immédiatement placées dans une solution relaxante (R) à 4°C, contenant 5 mM d'EGTA et de l'ATP. Quatre heures plus tard, les biopsies sont rincées dans une solution R puis replacées dans une solution R pour une durée de vingt-quatre heures. Les biopsies sont ensuite placées dans une solution de conservation (C) contenant du glycérol, de la pepstatine A (1 µg/ml) et de la leupeptine (5 mg/ml). La pepstatine A et la leupeptine sont des inhibiteurs de protéases qui préviennent toute perte de force pouvant résulter de la dégradation des protéines, sans avoir d'effet propre sur l'activation calcique des fibres traitées (Kasuga et Umazume, 1990). Les biopsies sont ainsi conservées à -20°C jusqu'à deux mois.

II – B. Isolement des fibres et mise en évidence dans le dispositif d'enregistrement

Toutes les biopsies utilisées dans ce travail ont été conservées entre deux ou trois semaines. L'isolement des fibres s'effectue sous loupe binoculaire (x 80), à l'aide de pinces fines. Une fibre de 6 à 8 mm de long est isolée de la biopsie. Un fil de soie est noué à chaque extrémité d'un segment de 5 mm. Ceci permet de monter la fibre entre une pince fixe et un capteur de force dans une cuve expérimentale contenant une 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, ce 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 et permettant la lecture directe de la longueur de sarcomère au repos (sur le muscle soleus, cette valeur est en

moyenne de $2,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$). La fibre est ensuite étirée à 120 % de la longueur du sarcomère au repos, ce qui assure un chevauchement des myofilaments d'actine et de myosine permettant le développement d'une force isométrique optimale.

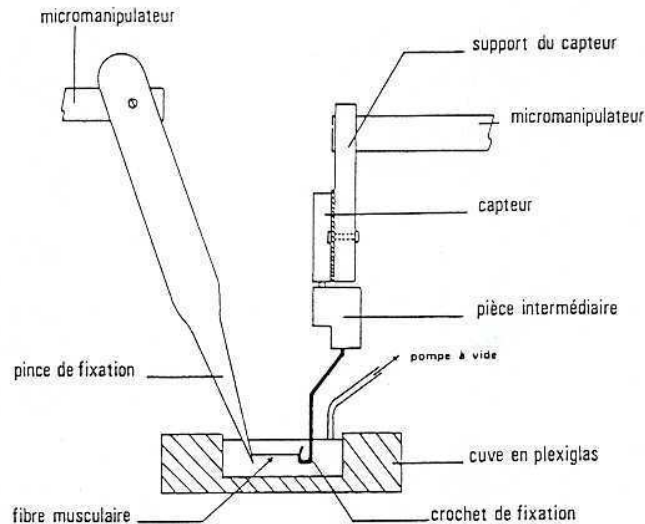


Figure 30 : Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques.

II – C. 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). On applique ensuite deux solutions de strontium pSr contenant de l'ATP : la pSr 5,0 ($p\text{Sr} = -\log[\text{Sr}^{2+}]$) puis la pSr 3,4 pour distinguer les fibres lentes des fibres rapides. En effet, si la fibre développe une tension après l'application de la pSr 5,0, celle-ci est dite lente sinon elle est rapide (Fink et coll., 1986 ; Stevens et coll., 1993). Ensuite, on applique une solution pCa ($p\text{Ca} = -\log[\text{Ca}^{2+}]$) contenant de l'ATP. 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). Les

fibres présentant des pertes de forces supérieures à 20 % à la fin de l'expérience sont rejetées. 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.

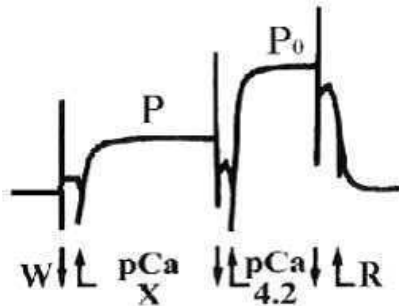


Figure 31 : Exemple de tracé d'un cycle expérimental sur une fibre musculaire isolée.

II – D. Expression des résultats

La sensibilité et l'affinité calcique du système contractile sont respectivement déterminées par le seuil d'activation et le critère pCa_{50} . La coopérativité au sein des myofilaments qui traduit les interactions entre les protéines 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 symétrique. n_1 correspond à la pente de la courbe quand P/P_0 est supérieur à 50 % et n_2 à la pente de la courbe quand P/P_0 est inférieur à 50 %.

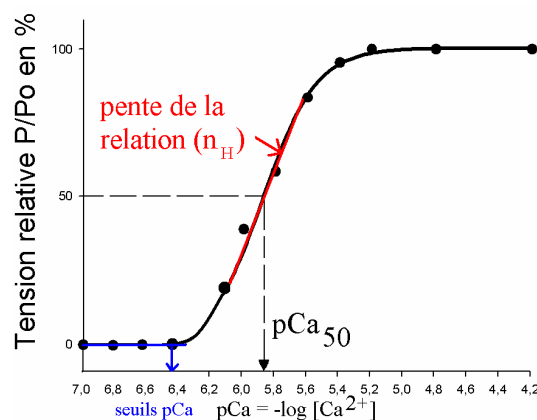


Figure 32 : Présentation des différents paramètres d'activation calcique des fibres pelées.

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. Les modifications d'expression de certaines protéines régulatrices peuvent moduler les paramètres de cette courbe. La pCa₅₀ et le seuil sont directement couplés aux isoformes de TnC alors que la coopérativité est couplée aux isoformes de TnT et de tropomyosine (Moss et coll., 1986 ; Babu et coll., 1987 ; Schachat et coll., 1987 ; Greaser et coll., 1988 ; Bastide et coll., 2002).

II – E. Rôle de la O-GlcNAc sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires

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

Pour ces expériences, 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 rôle 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 Ca²⁺, sans altérer le système contractile. Trois protocoles sont alors utilisés :

➤ Le premier (figure 33 A) consiste en deux incubations d'une heure de la fibre : la première s'effectue dans une solution R ne contenant que de l'ATP et la seconde dans du R + ATP + 0,2 M de GlcNAc ou de GalNAc ou de glycérol. La GalNAc et le glycérol représentent les molécules contrôles de l'effet de la O-GlcNAc : le glycérol nous permet de tester l'effet de l'hyperosmolarité sur les propriétés contractiles des fibres musculaires et l'utilisation de la GalNAc permet de tester la spécificité de l'effet potentiel de la GlcNAc. La concentration 0,2 M correspond à la concentration optimale utilisée en chromatographie d'affinité pour éluer des protéines O-GlcNAc reconnues par la WGA (Wheat Germ

Agglutinin), une lectine spécifique de la *O*-GlcNAc. Des expériences préliminaires ont permis de démontrer que des doses de 0,02 M étaient insuffisantes pour produire un effet reproductif. Après chaque incubation, une relation T/pCa est réalisée en présence ou en absence de la molécule testée et après rinçage pour déterminer la réversibilité de l'effet mesuré.

➤ Dans l'autre protocole (figure 33 B), la fibre subit deux incubations d'une heure chacune : une première incubation dans de la GalNAc à 0,2 M suivie d'une seconde incubation dans de la GlcNAc à 0,2 M.

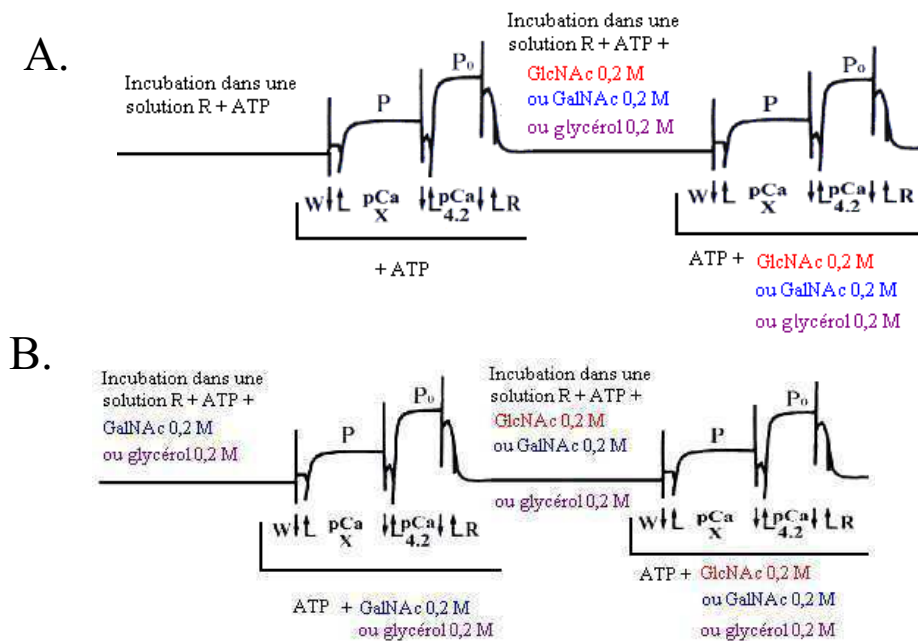


Figure 33 : Protocoles expérimentaux.

2. Mise en évidence d'un éventuel rôle des motifs *O*-GlcNAc libres sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires

Les fibres sont incubées une heure dans une solution R contenant de l'ATP et de la WGA à une concentration de 0,5 mg/mL. Le choix de la concentration en WGA a été fait en accord avec les rares références bibliographiques testant l'effet d'une neutralisation du motif *O*-GlcNAc (Finlay et coll., 1987). Des expériences préliminaires ont permis de voir qu'il n'y avait pas d'effet pour des concentrations de 0, 05 mg/mL. Les mêmes expériences sont réalisées avec de la WGA dénaturée ou préalablement incubée avec 0,02 M de GlcNAc. Nous établissons des relations T/pCa en présence ou en absence de WGA ou de WGA dénaturée ou de WGA préalablement incubée avec la GlcNAc.

II – F. Composition des solutions

Les produits chimiques entrant dans la composition des solutions proviennent de Sigma Chemicals (St Louis, USA). La composition de toutes les solutions utilisées pour l'établissement des relations T/pCa a été établie à l'aide du programme Fabiato (1988), en utilisant les constantes d'association d'Orentlicher et coll. (1977) pour le Ca^{2+} , et par Moissescu et Thieleczek (1979) pour le Sr^{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).

La composition des solutions C, R et W (en mM) est donnée dans le tableau suivant (Tableau X).

Tableau X : Composition des solutions R, C et W en molarité.

	Solution de pelage ou relaxante (R)	Solution de conservation (C)	Solution de lavage (W)
Propionate de potassium	170	170	185
Acétate de magnésium	2,5	2,5	2,5
K ₂ EGTA	5	5	-
MOPS	20	20	20
Glycérol	-	50% (v/v)	-

Les solutions activatrices sont confectionnées à partir des mêmes composants que la solution W. Le Ca^{2+} libre est tamponné par du K₂EGTA et du Ca EGTA (ou Sr EGTA) additionnés en proportions adéquates pour obtenir des concentrations comprises entre pCa 7,0 et pCa 4,2.

II – G. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leurs erreurs standards (SEM). Les différences sont estimées par une analyse ANOVA complétée par un test t de Student pour séries appariées dans le cas de fibres soumises à deux conditions différentes ou un test de Bonferroni dans le cas des analyses du bed-rest.

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

III. Techniques électrophorétiques

III – A. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse monodimensionnelle

Les muscles sont broyés et réduits à l'état de poudre. Les protéines contractiles sont extraites de cette poudre selon le protocole suivant : la poudre de muscle est resuspendue dans 1 mL d'une solution d'EDTA à 5 mM, pH 7, contenant des antiprotéases (pepstatine et Phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF). 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 KCl à 50 mM contenant des antiprotéases, puis centrifugé à 13 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes.

Le culot est ensuite repris dans de l'eau ultrapure, soniqué 1 minute dans la glace, puis centrifugé à 14 000 rpm 1 heure à 4°C. Un dosage protéique est réalisé sur le surnageant selon la méthode de Lowry. 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 12000 rpm, 15 minutes à 4°C, le culot protéique est resuspendu dans le tampon de Laemmli (Tris HCl, pH 6,8 ; SDS ; glycérol ; β mercaptoethanol 5 %) en vue d'une électrophorèse monodimensionnelle.

III – B. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse bidimensionnelle

Les muscles fraîchement prélevés sont manipulés sous azote liquide. Placés dans une coupelle en métal, ils sont réduits à l'état de poudre.

Pour la préparation des phosphoprotéines, les protéines ont été extraites à partir de poudre de muscle obtenue à partir du protocole décrit au paragraphe III.B. La technique d'extraction utilisée correspond à une rupture membranaire à l'EGTA et une double précipitation en milieu hyperosmotique, ces deux étapes se déroulant en présence de divers inhibiteurs de protéases et phosphatases, afin d'éliminer toute activité enzymatique pouvant modifier le niveau de phosphorylation des MLC post-mortem. Par précaution, une autre technique consistant à un broyage du muscle entier frais dans un mélange acétone / 10 % acide trichloroacétique éliminant toute activité enzymatique (même à -80°C) a été utilisée. Aucune différence dans les résultats obtenus suite à l'utilisation de ces deux protocoles n'a été déterminée (données non montrées).

Dans notre protocole, 10 mg de poudre musculaire ont été placés dans 1.2 mL d'un mélange d'EGTA 6.3 mM (pH7), de PMSF 1 % et de pepstatine 0.1 %. Après action du mélange et centrifugation à 13000 rpm, le culot est récupéré puis placé dans une solution de KCl 50mM, PMSF 1%, pepstatine 0.1 %, et centrifugé à 13000 rpm. Les protéines récupérées sont placées dans 1mL d'eau milliQ et dosées avec le kit Biorad (Dc Protein Assay, Bio-Rad).

III – C. Electrophorèse monodimensionnelle

Les fibres sont dissoutes dans 20µL de tampon de lyse et chauffées 3 minutes à 90°C.

Le culot protéique résultant de l'extraction des protéines contractiles et issu de la précipitation à l'acétone est repris par du tampon de Laemmli, puis chauffé 10 minutes à 100°C. Les protéines sont séparées par un gel SDS-PAGE selon un gradient linéaire de 10 %-20 % ou un gel de 7,5 % plus spécifique aux MHC. La migration est réalisée à intensité constante (13 mA pour un gel de 0,75 mm d'épaisseur) alors que pour les gels MHC, la migration se fait à voltage constant (70 V pour un gel de 0,75 mm d'épaisseur). Dans les deux cas, le tampon de migration est composé de 190 mM de glycine, 25 mM de Tris et 0,1 % de SDS.

A l'issue de la migration, le gel est coloré au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie. Pour l'identification, les protéines séparées par électrophorèse seront transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm en vue d'analyses par immunoblot.

III – D. Electrophorèse bidimensionnelle ou 2D

L'électrophorèse 2D a été utilisée afin de séparer les différentes isoformes de MLC en particulier en fonction de leurs modifications post-traductionnelles. Cette technique, schématisée dans la figure 34, permet de séparer les différentes protéines selon deux migrations électrophorétiques consécutives et perpendiculaires, fondées pour la première sur leur point isoélectrique (Pi), et pour la seconde, sur leur poids moléculaire. Les deux séparations étant indépendantes, elles confèrent à cette technique un pouvoir de résolution élevé.

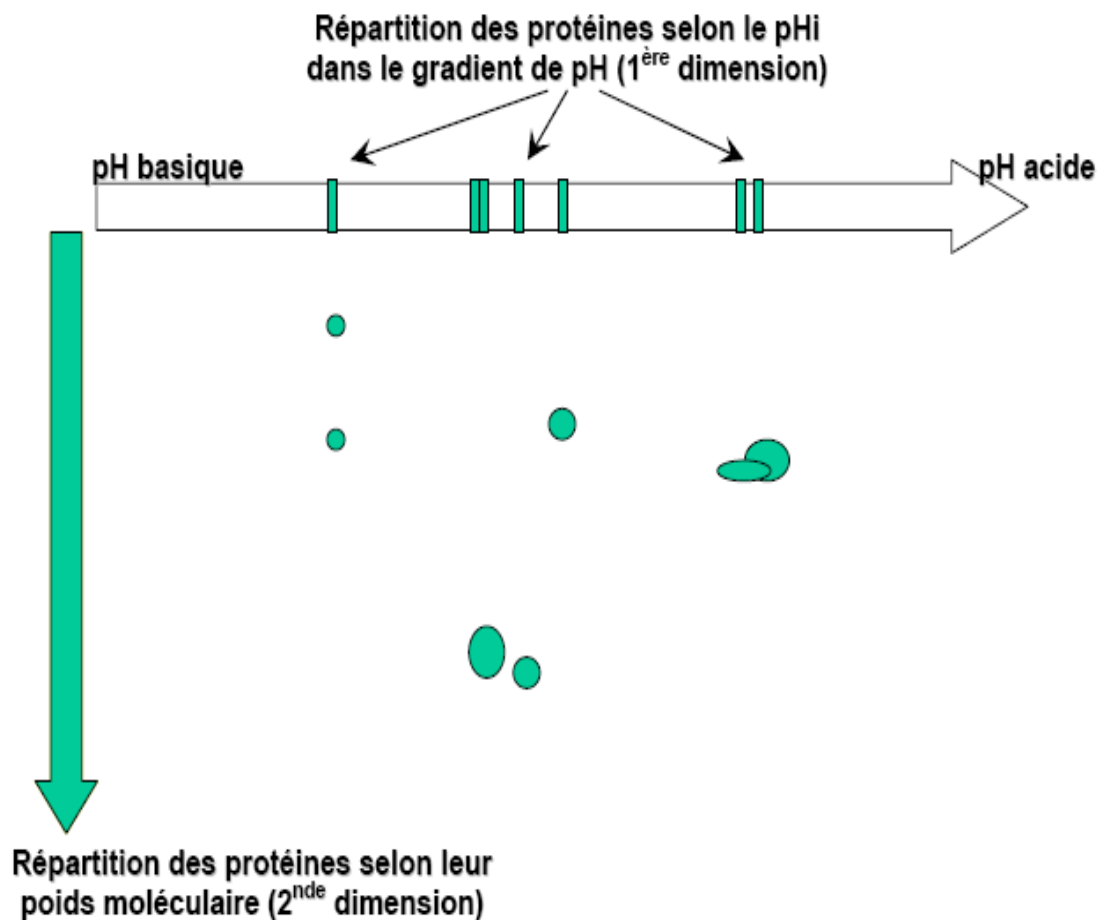


Figure 34 : Schématisation du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.

1. La première dimension : l'isoélectrofocalisation (IEF)

Il s'agit de la première migration électrophorétique de la 2D. Elle utilise le point isoélectrique (pH spécifique pour lequel la charge de la protéine est nulle) des protéines afin de les faire migrer dans un gradient de pH préalablement établi dans un gel d'acrylamide à réticulation large. Le gradient de pH est établi dans un gel d'acrylamide à 4 % d'une épaisseur de 0.5 mm et de dimension 11 cm x 3 mm, provenant des laboratoires Amersham (Immobiline Drystrip, Amersham Biosciences). La faible réticulation du strip permettra une absorption et une migration facilitées des protéines. Le gradient de pH est créé à l'aide de molécules chargées et stables fixées dans le gel, appelées immobilines. Le pI des MLC étant de l'ordre de pH 5.0 et l'ajout d'un groupement phosphate à une protéine déplaçant le pI d'environ 0.3 unités de pH vers le pôle acide, nous avons choisi d'utiliser un gradient de pH 4–7.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Soixante-dix μg de protéines sont précipitées dans de l'acétone. Cette quantité testée préalablement, correspond à la quantité adéquate à l'étude de la phosphorylation de la MLC_2 . (Bozzo et coll., 2003). Les protéines sont ensuite récupérées dans 240 μL d'un tampon de réhydratation composé d'un agent chaotrope non chargé (pour ne pas modifier le P_i des protéines), l'urée 8 M, qui dénature les protéines en éliminant les liaisons covalentes et ioniques, de CHAPS 2 % (détergent), de dithiotréitol 1 % (qui rompt les ponts disulfures), et d'ampholines. Ces dernières sont des molécules similaires aux immobilines citées précédemment, correspondant au gradient de pH choisi, et améliorent la solubilité des protéines à l'intérieur du gradient de pH.

Le mélange protéines / tampon de réhydratation est déposé dans un sarcophage en céramique (Amersham) (figure 35). Le strip contenant le gel d'acrylamide avec son gradient de pH défini, est placé sur ce mélange qui le réhydratera très lentement, lui faisant absorber les protéines solubilisées. Cette réhydratation passive précèdera une étape de réhydratation active nécessaire pour optimiser l'absorption des protéines dans le strip. Celui-ci est alors recouvert d'un film d'huile minérale pour éviter toute évaporation du tampon.



Figure 35 : *Etapes d'application d'un strip pour l'isoélectrofocalisation dans un sarcophage en céramique.*

Le sarcophage est ensuite placé dans un appareil (Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System, Amersham Biosciences) (figure 36) permettant de générer les courants choisis pour le protocole par l'intermédiaire d'une feuille d'or très conductrice et quasi-inoxydable évitant toute perturbation dans la transmission des courants électriques. Cet appareil permet aussi de réguler la température grâce à un système à effet Peltier. Celle-ci est réglée à 20°C , température à laquelle l'urée ne cristallise pas.



Figure 36 : Appareil IPGphor permettant de réaliser l'isoélectrofocalisation.

Tous les courants électriques sont délivrés à ampérage constant de 50 μ A. La réhydratation du strip s'effectue de manière active, c'est-à-dire sous courant électrique de 50 V pendant 15 h. Par la suite, différents courants croissants vont permettre de faire migrer les protéines, en commençant par les protéines de petite taille généralement faiblement chargées, pour déplacer peu à peu, les protéines de taille plus importante. Nous avons utilisé différentes étapes :

- 500V, 1 h en continu
- 1000 V, 1 h suivant un gradient
- 2000 V, 1 h en continu
- 3000 V, 1 h en continu
- 8000 V jusqu'à atteindre 100000 V, le temps de migration s'adaptant afin d'atteindre cette valeur.

2. Protocole de rééquilibration

Après isoélectrofocalisation, les protéines sont soumises à une séparation dans un gel de polyacrylamide à 15 % identique à celui utilisé pour l'analyse monodimensionnelle des MLC. Afin de permettre cette migration, il est nécessaire de donner aux protéines une charge nette négative. Les strips contenant les protéines sont donc baignés dans deux tampons d'équilibration composés d'urée 6 M, glycérol 30 %, SDS 2 % (qui charge négativement les protéines), TrisHCl 0.375 M et DTT 2 % (tampon 1) ou iodoacétamide 2.5 % (tampon 2), agent alcalin empêchant la reformation des ponts disulfures. Une fois les protéines chargées, le strip est placé sur le gel.

Le tampon de migration est le même que celui utilisé pour l'électrophorèse monodimensionnelle (voir paragraphe III.C.). La migration se déroule à ampérage constant (16 mA/gel de 1 mm d'épaisseur) pendant 6 h.

III – E. Coloration au Nitrate d'argent

Les gels sont colorés par une solution d'argent ammoniacale permettant la détection de l'ordre du 5 ng de protéines par puits. Après migration, le gel est fixé en deux étapes : la première se fait dans un bain contenant 50 % (v/v) de méthanol et 10 % d'acide acétique, puis dans une solution à 5 % de méthanol et 7 % d'acide acétique. Dans un second temps, le gel est incubé pendant une nuit dans une solution de glutaraldéhyde (10 % v/v) qui améliore la rétention des protéines de faible poids moléculaire. Des rinçages à l'eau pure (toutes les vingt minutes pendant deux heures trente) assurent l'élimination de l'excès de glutaraldéhyde.

Les gels sont ensuite colorés pendant vingt minutes à l'abri de la lumière dans une solution contenant 0,5 % (v/v) d'ammoniaque, 0,075 % (v/v) de soude et 0,8 % (p/v) de nitrate d'argent.

Après cinq rinçages d'environ une minute dans de l'eau pure, la révélation est initiée par un bain de citrate de sodium (0,5 % p/v) et de formaldéhyde (0,18 % v/v). La révélation est arrêtée par un bain d'acide acétique à 1 % (v/v) pendant cinq minutes. Le gel est ensuite photographié.

III – F. 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 2g de Coomassie R-250 pendant 2 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 – G. Analyse des spots

L'analyse des intensités de signaux protéiques des gels 1D et 2D est effectuée à l'aide d'un système Bioscan de Biorad. Les gels ou films sont scannés à l'aide d'un scanner GS-800 (Biorad) et l'intensité des signaux est analysée par le programme Quantity One (Biorad).

IV. Technique de Western Blot

IV – A. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après électrophorèse monodimensionnelle, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm. Le transfert est réalisé pendant deux heures à 200 mA dans le tampon de transfert : 20 mM Tris, 150 mM glycine, 20 % méthanol.

L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration au rouge ponceau.

IV – B. Marquage aux anticorps pour la glycoylation

1. Révélation à la WGA

Les motifs O-N-acétylglucosamine sont révélés par une lectine isolée du germe de blé triticum vulgaris : 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 5 % de sérum albumine bovine dans le tampon TBST (15 Mm Tris ; 140Mm NaCl ; 0,05 % Tween-20) pendant au moins deux heures puis lavées deux fois 10 minutes dans du 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 à température ambiante dans le tampon (50mM 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 4 heures de lavages 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 une heure

sous agitation lente à l'abri de la lumière dans 5 % de sérum albumine bovine (BSA) dans le TBST. La membrane est lavée au TBST, puis la détection est réalisée par chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham) sur film photographique (Hyperfilm MP, Kodak).

2. Révélation avec le RL-2

Après transfert, la membrane est saturée par une solution de 5 % de BSA dans le TBST pendant au moins deux heures.

Après deux fois 10 minutes de lavages au TBST, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire anti *O*-GlcNAc ou RL-2 (Affinity BioReagent) une nuit à 4°C à une dilution de 1/500^e dans 5% de BSA dans le TBST.

Après 5X10 minutes de lavages au TBST, la membrane est incubée en présence d'un anticorps secondaire directement couplé à la peroxydase dilué au 1/10 000 dans 5 % de BSA dans le TBST, 1 heure sous agitation lente.

Après 5X10 minutes de lavages au TBST, la membrane est révélée par chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham) sur film photographique (Hyperfilm MP, Kodak).

V. Identification des sites de *O*-GlcNAc par la BEMAD (β -elimination and Michael addition with DTT)

Le protocole utilisé et basé sur les travaux de G. Hart (Wells et coll., 2002) a été affiné en utilisant d'abord un peptide synthétique *O*-GlcNAc avant d'être appliqué sur des échantillons protéiques. Cette phase de mise au point a nécessité près de six mois de travail. Les durées d'oxydation performique et de BEMAD, les concentrations de certaines molécules ont été les points qui ont nécessité le plus d'attention.

L'efficacité de la technique pour modifier et purifier le peptide *O*-GlcNAc a été analysée en spectrométrie de masse par MALDI-TOF.

La figure 37 est un spectre MS du peptide synthétique *O*-GlcNAc après 8 heures de BEMAD.

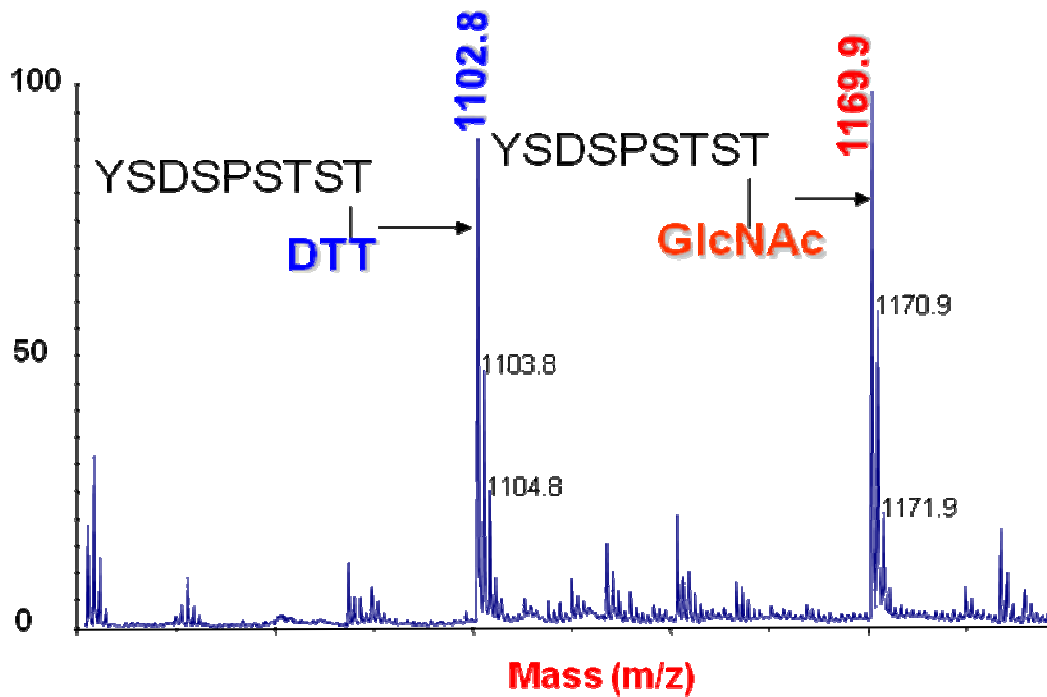


Figure 37 : Spectre MS du peptide synthétique O-GlcNAc après huit heures de BEMAD.

Cinquante pourcent du peptide O-GlcNAc est converti en peptide DTT après 8 heures de BEMAD.

Différents temps et conditions ont été testés sans que cela ne puisse améliorer le rendement.

V – A. Oxydation performique

L'oxydation performique a pour but d'oxyder les cystéines. Le réactif (5 % d'H₂O₂ à 30% et 45% d'acide formique à 88 %) est laissé une heure à température ambiante puis 30 minutes dans la glace.

Ensuite, le culot protéique est incubé une heure dans de la glace dans 500 µL de cette solution.

Les protéines sont ensuite lyophilisées pour être digérées par la trypsine.

V – B. Trypsine

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

engage sa fonction acide dans un tampon de 50 mM d'ammonium bicarbonate avec un rapport de 1mg de trypsine pour 50 mg de protéines. La digestion est réalisée à 37°C sur la nuit.

Les protéines sont ensuite chauffées à 100°C pendant 5 minutes pour stopper la réaction et lyophilisées.

V – C. Digestion à la phosphatase

Les peptides ainsi obtenus sont resuspendus dans 500 µL d'une solution de 40 mM d'Ammonium bicarbonate et 1 mM de magnésium chloride hexahydrate à 90 %. Puis, 20 µL de phosphatase sont rajoutés aux échantillons. La réaction est réalisée à 37°C sur la nuit.

Les peptides sont ensuite lyophilisés.

V – D. Digestion par la β -hexosaminidase

Afin de contrôler la spécificité de notre protocole pour purifier les peptides *O*-GlcNAc, des expériences ont été réalisées après digestion de la liaison *O*-GlcNAc par une β -hexosaminidase.

Les peptides sont resuspendus dans 500 µL d'une solution de 50 mM d'Ammonium formique à pH 4,6 (ajuster avec de l'acide formique très diluée). Puis, 20 µL de β -hexosaminidase sont rajoutés dans ce tampon. La réaction est réalisée à 37°C sur la nuit.

Le lendemain, 10 µL d'enzyme sont rajoutés aux peptides. La réaction se fait toujours à 37°C sur la nuit.

48 heures plus tard, les peptides sont chauffés 5 minutes à 100°C pour arrêter la réaction. Les échantillons peptidiques sont ensuite lyophilisés.

V – E. Sep pack C₁₈

Les peptides avec ou sans digestion à la β -hexosaminidase, sont ensuite purifiés par chromatographie inverse sur colonne C₁₈. Celle-ci est tout d'abord activée par du méthanol puis lavée par de l'eau contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique (ATFA).

Les échantillons peptidiques repris dans 1,5 mL d'eau/ATFA 0,1 % sont déposés sur les colonnes. Les peptides se fixent alors sur la phase stationnaire.

Les colonnes sont lavées par de l'eau/ATFA 0,1 % et les peptides élués par 0,1 % d'ATFA dans un mélange acétonitrile/eau (80/20, v/v).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'éluat est ensuite mis sous azote pendant 30 minutes et lyophilisé.

V – F. BEMAD

Les peptides sont incubés dans 600 μ L d'une solution de 1.5 % TEA, 0.15 % NaOH, 20 % d'éthanol et 20 mM de DTT à pH 12,5 et préalablement dégazée. La réaction est réalisée à 52°C pendant 8 heures. La durée de la réaction et la concentration de DTT ont été choisies après que différents temps et différentes concentrations en DTT aient été testés sur un peptide *O*-GlcNAc synthétique.

La réaction est ensuite stoppée par ajout d'eau/ATFA 10 % à une concentration finale de 1 % et les peptides sont purifiés sur sep pack C₁₈.

V – G. Colonnes Thiol

Pendant une heure, les billes Thiol Sepharose 6B sont réhydratées à 4°C dans une solution de 20 mM Tris, 150 mM NaCl et 1 mM EDTA, préalablement dégazée une heure.

Les billes sont ensuite lavées 20 fois dans ce même tampon et incubées en présence de l'échantillon 4 heures à 4°C sous agitation lente.

Les billes sont mises dans un réservoir et lavées 50 fois dans le tampon de départ pour être ensuite incubées en présence de 20 mM de DTT dans le tampon de départ, 1 heure sous agitation rapide, après un flush sous argon.

Les peptides DTT sont ensuite élués. Pour s'assurer que tous les peptides DTT sont élués, 3 lavages en présence de 20 mM de DTT sont réalisés. Ces derniers sont ensuite lyophilisés et purifiés sur une Sep pack C₁₈.

V – H. ZIP-TIP

Les peptides DTT sont resuspendus dans 100 μ L d'eau/ATFA 0,1 % puis le dessalage de l'échantillon peptidique est réalisé par chromatographie en phase inverse, sur colonne de Zip-TipC₁₈ (Millipore).

La colonne est activée par le méthanol, puis lavée avec de l'eau/ATFA 0,1 %. La fixation des peptides se fait par aller-retour successifs du Zip-Tip dans la solution peptidique, puis l'éluion des peptides est réalisée, après rinçages de la colonne dans de l'eau/ATFA 0,1 % dans 10 μ L de 0,1 % ATFA dans un mélange acétonitrile/eau (80/20, v/v). Les échantillons peptidiques dessalés sont séchés au speed-vac.

VI. Identification des protéines par spectrométrie de masse

VI. 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 de 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 rincées successivement plusieurs fois par de l'eau ultrapure. Les morceaux de gel sont ensuite déshydratés 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.

VI. 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 ajoutée 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.

VI. 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 aliquots.

VI. D – Microdessalage sur Zip-Tip C₁₈

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

VI – 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 de la plateforme protéomique de l'USTL.

Les échantillons peptidiques sont resuspendus dans 10 µL d'eau/ATFA 0,1% ; un microlitre d'échantillon est déposé sur la 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 50/50, v/v). Les mesures de masse moléculaire des peptides sont réalisés 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). On aura une empreinte peptidique et l'utilisation des banques de données permettra d'identifier selon une probabilité, la protéine.

La figure 38 résume les différentes étapes de la MS.

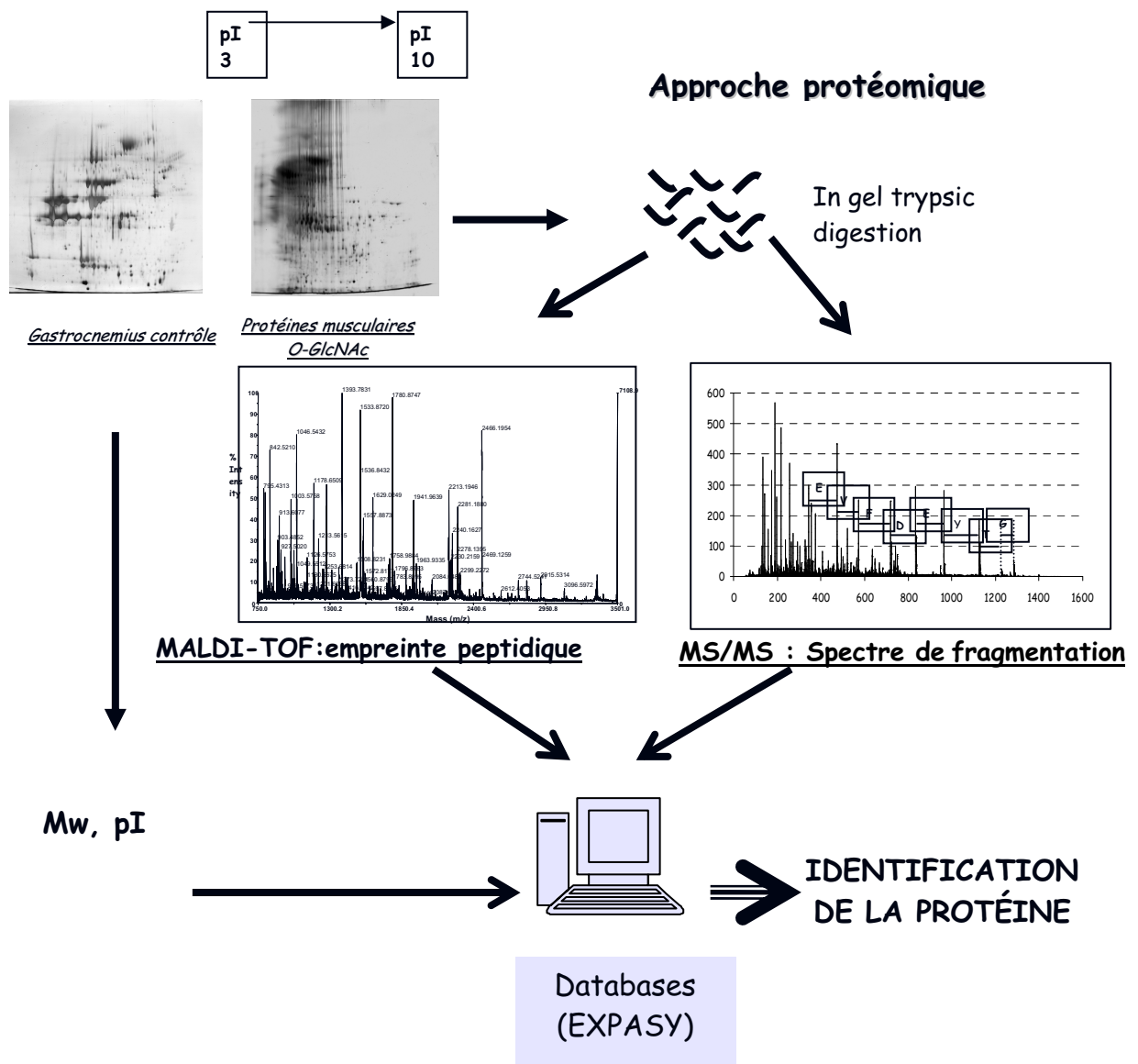


Figure 38 : Schématisation des différentes étapes de la MS.

2) Spectrométrie de masse en tandem

Les analyses NanoLC-nanoESI-MS/MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse à trappe ionique (LCQ Deca XP⁺, Thermo-electron, San Jose, CA) équipé d'une source nano-électrospray et couplé à une nano-chromatographie liquide (LC Packings Dionex,

Amsterdam, Pays-Bas) avec l'apport d'A. Page du Centre Commun de Spectrométrie de Masse à l'USTL (UMR 8009).

L'échantillon a été dilué avec 5 µL d'eau à 0,1% HCOOH. 1 µL est injecté dans le spectromètre de masse à l'aide d'un injecteur Famos (LC Packings Dionex). L'échantillon est d'abord dessalé et concentré sur une précolonne de phase inverse de dimension 0,3 mm i.d. x 5 mm (Dionex) avec le solvant A (H₂O/Acétonitrile-95/5-0,1% HCOOH) délivré par la pompe Switchos (LC Packings Dionex) à un débit de 10 µL/min pendant 2 min. Les peptides sont ensuite séparés sur une nanocolonne de 15 cm x 75 µm i.d., 3 µm C18 Pepmap de chez Dionex. Le débit est fixé à 200 nL/min. Les peptides sont élués avec un gradient linéaire allant de 5 à 80% de solvant B (H₂O/Acétonitrile-20/80-0,08 % HCOOH) en 180 min, puis de 80 à 100% de B en 5 min, avec un palier de 10 min puis retour aux conditions initiales en 1 min pendant 10 min pour rééquilibrer la colonne.

Les aiguilles nano-électrospray proviennent de chez New Objective (Woburn, MA). Le voltage du spray est de 1,5 kV, et la température du capillaire est à 170°C. Le spectromètre de masse opère en ionisation positive. L'acquisition des données est réalisée en mode data-dependent qui consiste à l'alternance d'un spectre MS entre m/z 500-2000 et d'un spectre MS/MS de l'ion sélectionné en mode d'exclusion dynamique (l'ion le plus intense est sélectionné et exclus de la sélection pour une durée de 3 min). Les données MS/MS sont acquises avec une fenêtre d'isolation des ions de 2 unités m/z et avec une énergie de collision de 35%. Les fichiers MS/MS .raw sont transformés en fichier .dta avec le logiciel Bioworks 3.1 (Thermo-electron). Les .dta générés sont ensuite regroupés en un seul fichier avec le logiciel merge.bat téléchargé sur MASCOT (version 2.2) pour ensuite effectuer la recherche dans la banque de données MSDB. Les paramètres de recherches sont les suivants: rat pour la taxonomie, 1 clivage oublié autorisé pour l'enzyme de digestion la trypsine, 2 Da pour la tolérance du peptide et 0,8 Da pour la tolérance en MS/MS, DTT comme modification variable.

Le schéma 39 résume les différentes étapes de la LC-MS/MS.

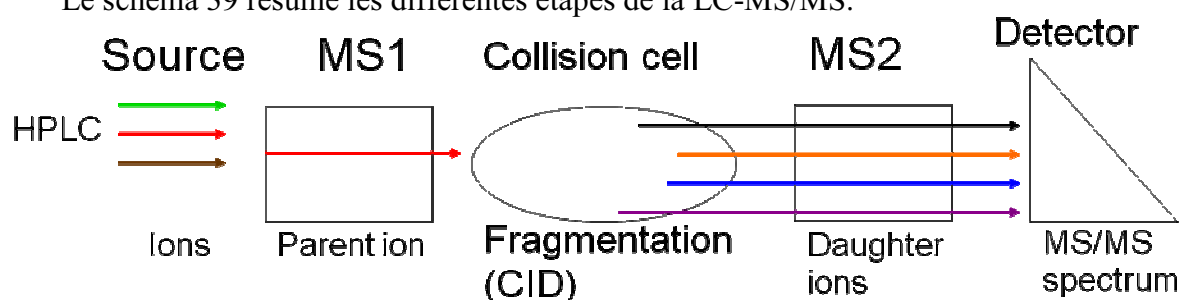


Figure 39 : Schématisation des différentes étapes de la LC-MS/MS.

L'analyse des spectres des peptides-DTT a été confirmée manuellement. Tout pic supérieur à 1 % de l'intensité de l'ion majoritaire a été considéré.

VII. Détermination du taux global de O-GlcNAc

VII – 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 CaCl_2 , 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 CaCl_2 , 50 % glycérol, pH 7,3.

VII – B. Dosage du taux de O-GlcNAc

Le taux global de O-GlcNAc est déterminé sur 100 μg de protéines musculaires par marquage radioactif. A un volume de 50 μL d'échantillon est ajouté 50 mU de galactosyltransférase, diluée dans 10 μL de tampon de marquage 10X (100 mM Hepes/NaOH ; 100 mM galactose ; 50 mM MnCl_2 ; pH 7,3). Le volume est ajusté à 90 μL avec de l'eau. La réaction est initiée par l'addition de 10 μL de 25 mM 5'-AMP contenant 3 μCi 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 μM 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.

VII – 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 (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% ATFA 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.

Chapitre IV

Résultats

Les résultats sont présentés en trois parties :

Partie I : La *O*-GlcNAc et les protéines contractiles.

Partie II : Identification des sites *O*-GlcNAc par une approche protéomique : la BEMAD.

Partie III : La *O*-GlcNAc et l'Atrophie musculaire.

Pour chacune d'elles, je ferai un bref justificatif du choix de l'expérience. Puis, je présenterai les résultats et une discussion.

Partie I

La O-GlcNAc et les protéines contractiles

I. Problématique

L'activité contractile est la fonction principale du muscle squelettique. Cieniewski et coll., 2004 ont démontré que les chaînes lourdes de myosine sont modifiées par la *O*-GlcNAc. D'autres protéines contractiles pourraient également porter ce motif *O*-GlcNAc. Le premier objectif de cette étude est donc de déterminer (1) si d'autres protéines contractiles portent le motif *O*-GlcNAc afin de déterminer si certaines interactions protéine-protéine du myofilament sont dépendantes de ce motif *O*-GlcNAc et (2) étudier les propriétés contractiles des fibres musculaires après avoir levé ces interactions protéiques.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication **Hedou,J., Cieniewski-Bernard,C., Leroy,Y., Michalski,J.C., Mounier,Y., and Bastide,B. (2007) O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. J.Biol.Chem., 282:10360-10369.**

Il peut aussi exister des 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. Le deuxième objectif de cette étude est donc d'étudier les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires après avoir masqué le motif *O*-GlcNAc « libre ».

II. Les résultats

II – A. Purification des protéines contractiles modifiées par la O-GlcNAc

1) 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 protéines musculaires en protéines contractiles.

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 40 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 réalisés au laboratoire (Kischel et coll., 2001 ; Bastide et coll., 2002 ; Stevens et coll., 2002).

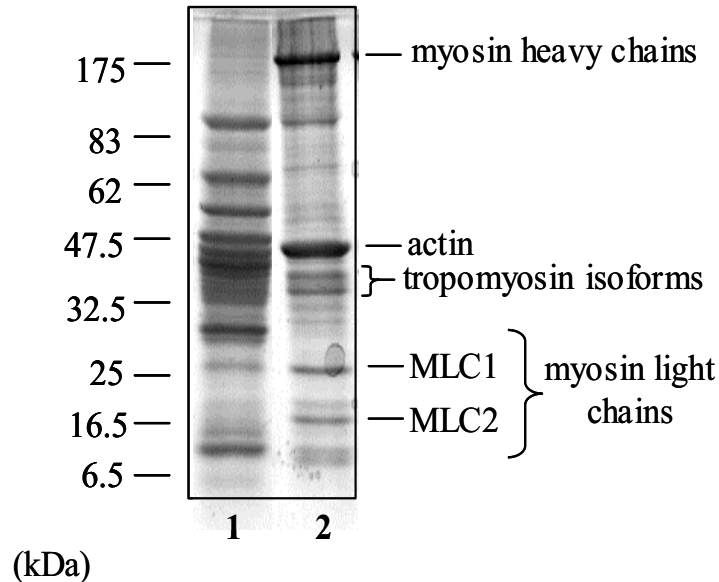


Figure 40 : Enrichissement d'un échantillon de gastrocnemius en protéines contractiles. (1) protéines totales ; (2) protéines contractiles.

2) 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 41. Un premier lavage de la colonne est réalisé par 0,5 M de N-acétylgalactosamine (puits 2 A et 2 B sur la figure 41) 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 A et 3 B sur la figure 41).

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 41).

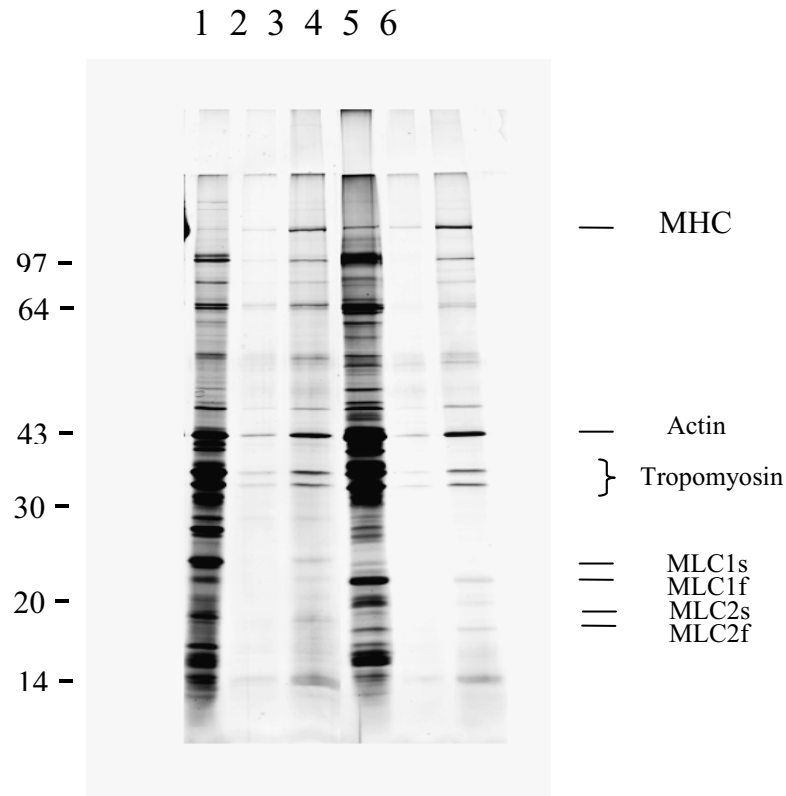


Figure 41 : SDS-PAGE 10-20 % et coloration au nitrate d'argent des protéines contractiles purifiées sur colonne de WGA-immobilisée à partir du muscle lent soleus (puits 1, 2, 3) et du muscle rapide EDL (4, 5, 6).

Puits 1 et 4 : partie non retenue ; puits 2 et 5 : lavage GalNAc 0,5 M ; puits 3 et 6 : élution GlcNAc 0,5 M.

La partie non retenue par la colonne (puits 1 et 4 de la figure 41) montre qu'une certaine proportion de protéines n'est pas modifiée par la O-GlcNAc. Cependant, le faible signal obtenu au niveau des puits 2 et 5 de la figure 41, 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 41. 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 41) 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. Si l'on compare les puits 1 et 4 avec les puits 3 et 6 de la figure 41, on s'aperçoit que seule une proportion de ces protéines est modifiée par la *O*-GlcNAc.

La nature *O*-GlcNAcylée de ces protéines est confirmée par immunoblot avec un anticorps anti-*O*-GlcNAc : le RL-2 (figure 42).

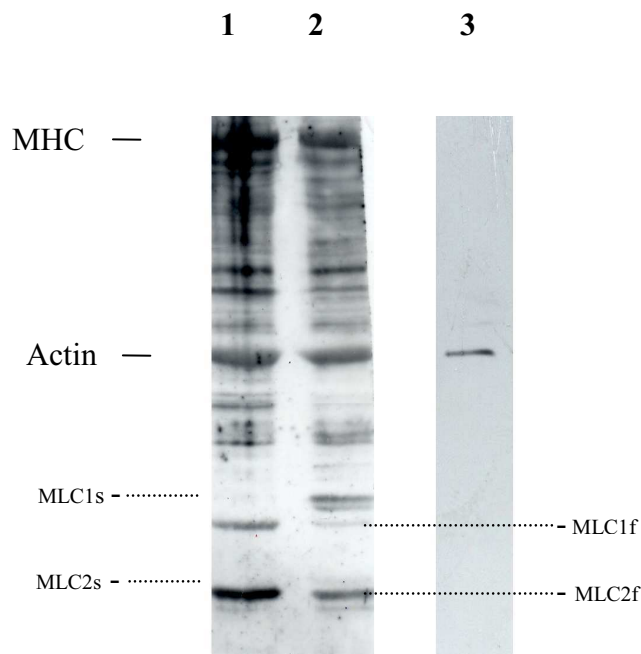


Figure 42 : Immunoblot des protéines contractiles avec un anticorps anti-*O*-GlcNAc (RL-2). (1) dans le soleus (2) dans l'EDL (3) incubation du RL-2 avec 0,5 M de GlcNAc.

Les MHC, l'actine et les MLCs sont reconnues par l'anticorps ce qui confirme bien la nature *O*-GlcNAcylée de ces protéines. La MLC_{2s} est faiblement détectée par rapport à la MLC_{2f}. Le RL-2 peut ne pas reconnaître une protéine *O*-GlcNAc. En effet, cet anticorps reconnaît en fait seulement une séquence spécifique de la *O*-GlcNAc correspondant au peptide qui a permis sa production. La faible détection ou l'absence de détection n'indique donc pas toujours l'absence du motif *O*-GlcNAc. L'incubation du RL-2 avec 0,5 M de GlcNAc libre inhibe la détection des protéines *O*-GlcNAc (bande 3).

L'identité de ces protéines contractiles sera confirmée par spectrométrie de masse.

3) 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). Afin de confirmer la nature O-GlcNAc des protéines contractiles, nous avons entrepris d'analyser les glycannes 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 sous l'expertise de Y. Leroy.

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 MLC_{2s} sont illustrés figure 43.

Le chromatogramme représenté figure 43-A indique la présence d'un composé issu de la MLC_{2s} 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 MLC_{2s} soit O-GlcNAc. La nature 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 43-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 MLC_{2s}.

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

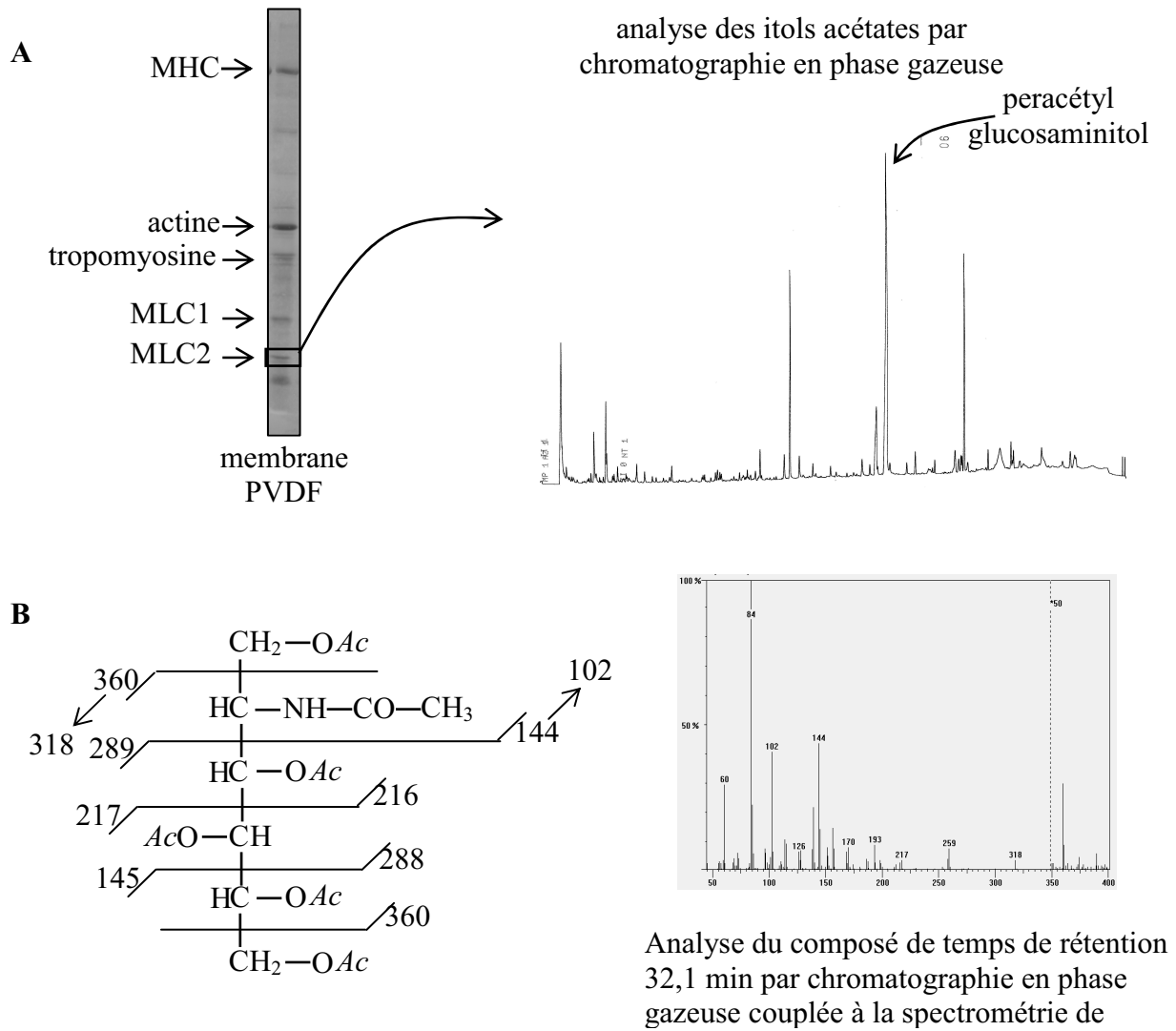


Figure 43 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des alditols acétates libérés d'une protéine préalablement séparée par SDS-PAGE. (A) Chromatogramme obtenu pour la bande protéique correspondant à la MLC_{2s} ; (B) Spectre de fragmentation obtenu par analyse en chromatographie en phase gazeuse du composé de temps de rétention 32,1 minutes.

Tableau XI : 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
MLC_{1s}	32,11 minutes	oui
MLC_{2s}	32,10 minutes	oui
MLC_{1f}	32,13 minutes	oui
MLC_{2f}	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.

II – B. Rôles des motifs O-GlcNAc entrant dans des interactions protéiques dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires.

1) 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 ; 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.

2) 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, afin de masquer le motif O-GlcNAc.

a) 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 le pelage chimique n'influe pas sur l'état O-GlcNAcylé. 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 44. Les protéines retenues par les billes et éluées 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 44-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 proche 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.

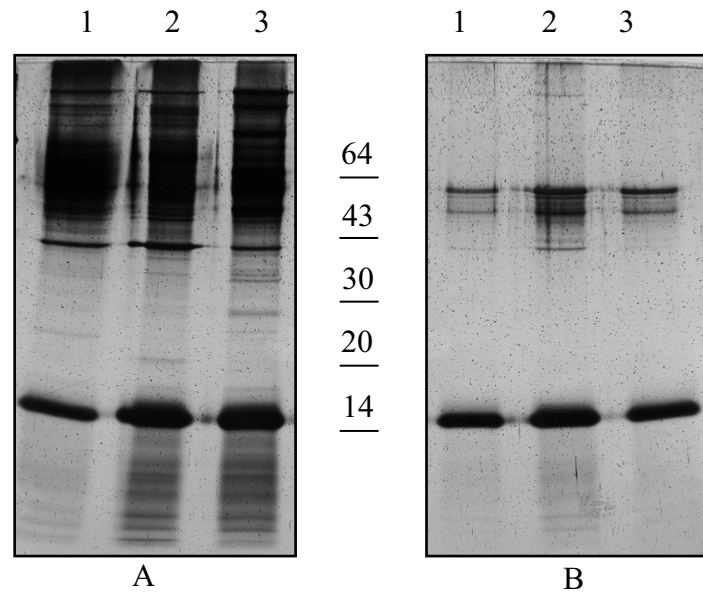


Figure 44 : SDS-PAGE 10-20 % de protéines musculaires O-GlcNAc fixées sur billes de WGA (en A) ou protéines musculaires restant fixées sur les billes après une élution par 0,2 M de N-acétylglucosamine (en B).

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

De plus, la figure 44-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.

Des expériences préliminaires nous ont permis de comparer les effets de différentes concentrations en GlcNAc (0,02 M ; 0,2 M; 0,5 M) et ont permis de démontrer que l'élution était optimale pour la concentration de 0,2 M couramment utilisée dans diverses études.

b) Effet de l'hyperosmolarité sur la sensibilité calcique

Nous avons déterminé précédemment qu'une concentration à 0,2 M de GlcNAc était suffisante pour lever *in vitro* les interactions dépendantes de la O-GlcNAc. Il faut cependant déterminer les effets propres de l'hyperosmolarité en testant une solution hypertonique de 0,2 M de glycérol sur les propriétés contractiles des fibres musculaires. Les relations Tension/pCa obtenues sont représentées figure 45. Les différents paramètres obtenus à partir des relations

Tension/pCa (seuil d'activation calcique (pCa_{thr}), 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 XII.

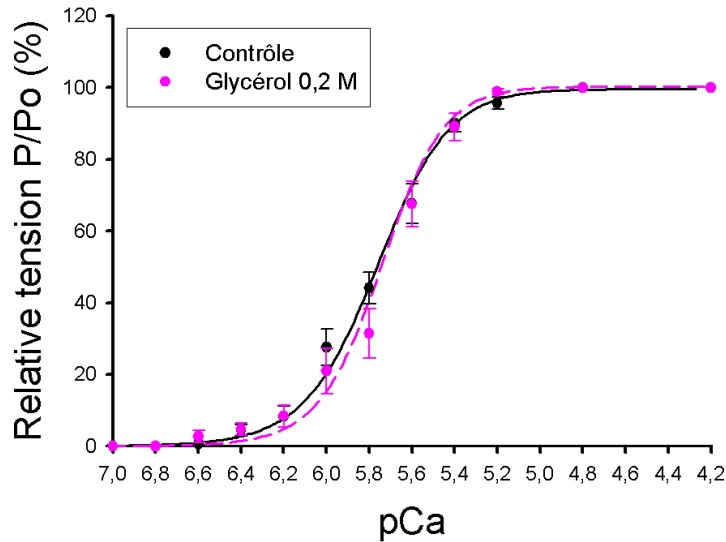


Figure 45 : Relation T/pCa des fibres musculaires obtenue après une incubation unique dans une solution de glycérol 0,2 M. $n=7$.

Tableau XII : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité après une incubation dans une solution de glycérol 0,2 M ($n=7$).

	Control	Glycerol
pCa_{thr}	6.74 ± 0.09	6.61 ± 0.12
pCa_{50}	5.77 ± 0.04	5.73 ± 0.05
n_1	2.46 ± 0.20	3.40 ± 0.72
n_2	2.62 ± 0.28	2.64 ± 0.29

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 inchangées. 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.

c) 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 46.

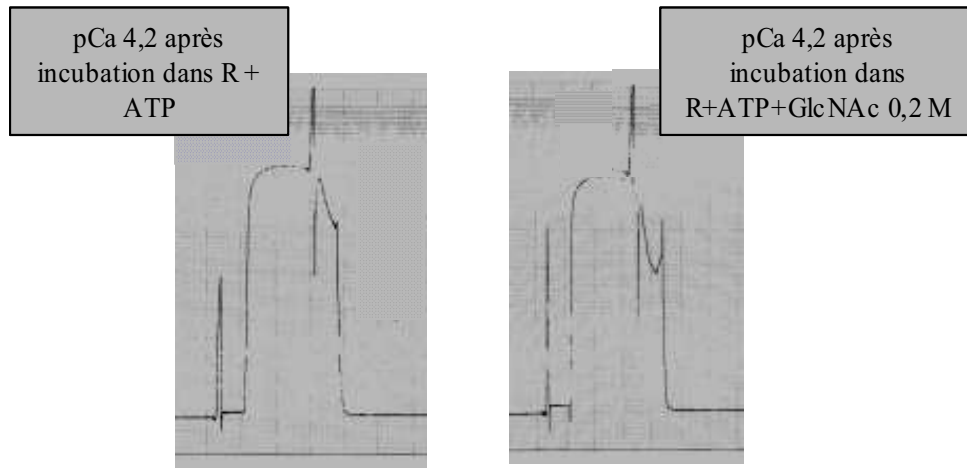


Figure 46 : Mesures des tensions maximales P_0 après une incubation de la fibre musculaire dans une solution de 0,2 M GlcNAc ($n = 3$).

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

d) Effet de la O-GlcNAc sur la sensibilité calcique

Nous avons préalablement montré que 0,2 M de GlcNAc permettrait de lever les interactions protéine-protéine mettant en jeu le 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 la 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 illustrée sur la figure 47 : 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 XIII. Les valeurs de pCa_{50} sont déterminées pour chaque fibre, la valeur reportée dans les tableaux correspondant à la valeur moyenne $\pm$ SEM.

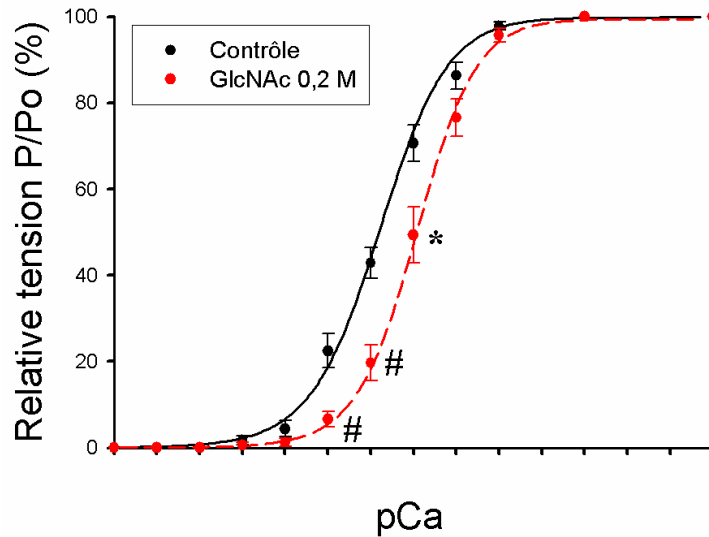


Figure 47 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M.

* $p < 0,05$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle.

$p < 0,01$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle. $n=11$.

Tableau XIII : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité après une incubation dans une solution de GlcNAc 0,2 M ($n=11$).

	Control	GlcNAc 0.2 M
pCa_{thr}	6.67 ± 0.09	6.36 ± 0.10 #
pCa_{50}	5.76 ± 0.03	5.59 ± 0.03 #
n_1	2.78 ± 0.21	2.89 ± 0.18
n_2	2.63 ± 0.18	3.27 ± 0.27

$p < 0,01$ GlcNAc 0,2 M vs 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 diminuées, 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 épimérie 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 représentés figure 48, et les valeurs de seuil d'activation calcique, la pCa_{50} , et les coefficients de Hill correspondant sont indiquées dans le tableau XIV. Ces résultats sont représentatifs de cinq fibres.

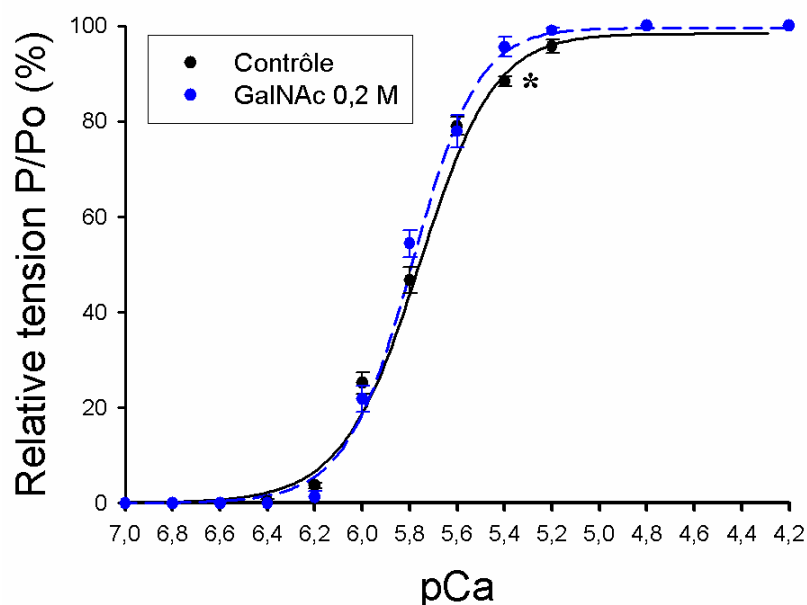


Figure 48 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M. * $p < 0,05$ GalNAc vs Contrôle. $n=5$.

Comme le montre la figure 48 ainsi que le tableau XIV, 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 XIV : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité après une incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M. $n=5$.

	Control	GalNAc 0.2 M
pCa_{thr}	6.64 ± 0.04	6.58 ± 0.06
pCa_{50}	5.79 ± 0.01	5.80 ± 0.02
n_1	2.09 ± 0.22	2.85 ± 0.13 *
n_2	3.40 ± 0.17	3.34 ± 0.26

* $p < 0,01$ GalNAc vs Contrôle.

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 six fibres, sont indiqués sur la figure 49 et le tableau XV.

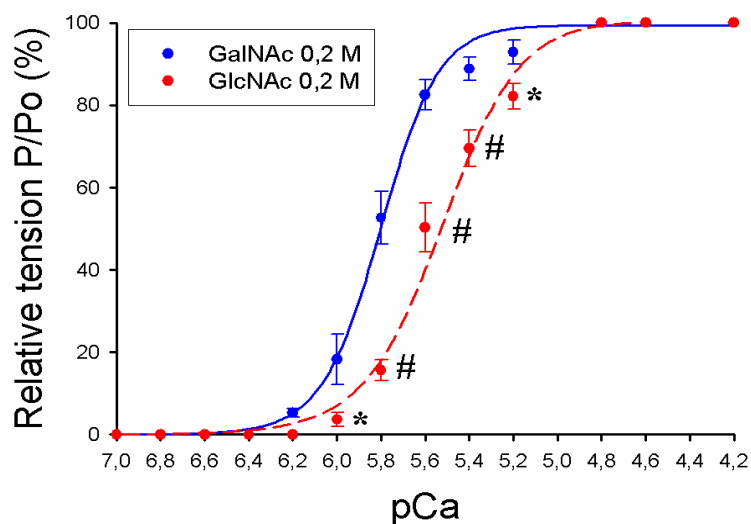


Figure 49 : Relation T/ pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc 0,2 M. * $p < 0,05$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle. # $p < 0,01$ GlcNAc 0,2 M vs Contrôle ($n=6$).

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 diminution de la pCa_{50} et du seuil calcique.

Tableau XV : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité après une incubation dans une solution de GalNAc 0,2 M suivie d'une incubation dans une solution de GlcNAc 0,2 M ($n=6$).

	GalNAc 0.2 M	GlcNAc 0.2 M
pCa_{thr}	6.42 ± 0.04	6.28 ± 0.03
pCa_{50}	5.87 ± 0.04	$5.59 \pm 0.04 \#$
n_1	2.08 ± 0.22	2.84 ± 0.13
n_2	4.29 ± 0.31	$2.74 \pm 0.24 \#$

* $p < 0,05$ GlcNAc 0,2 M vs GalNAc 0,2 M. # $p < 0,01$ GlcNAc vs GalNAc.

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 pourraient mettre en jeu des interactions protéiques *via* le motif O-GlcNAc.

L'effet observé en présence de GlcNAc est réversible puisque quand les fibres sont rincées dans une solution R, elles retrouvent leurs propriétés d'activation calcique initiales (figure 50).

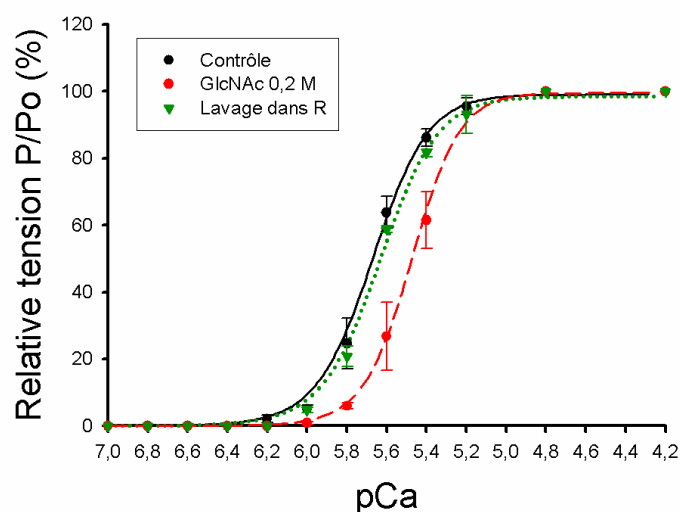


Figure 50: Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de GlcNAc à 0,2 M suivie d'un lavage dans une solution R. $n=3$.

e) 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 sur la figure 51.

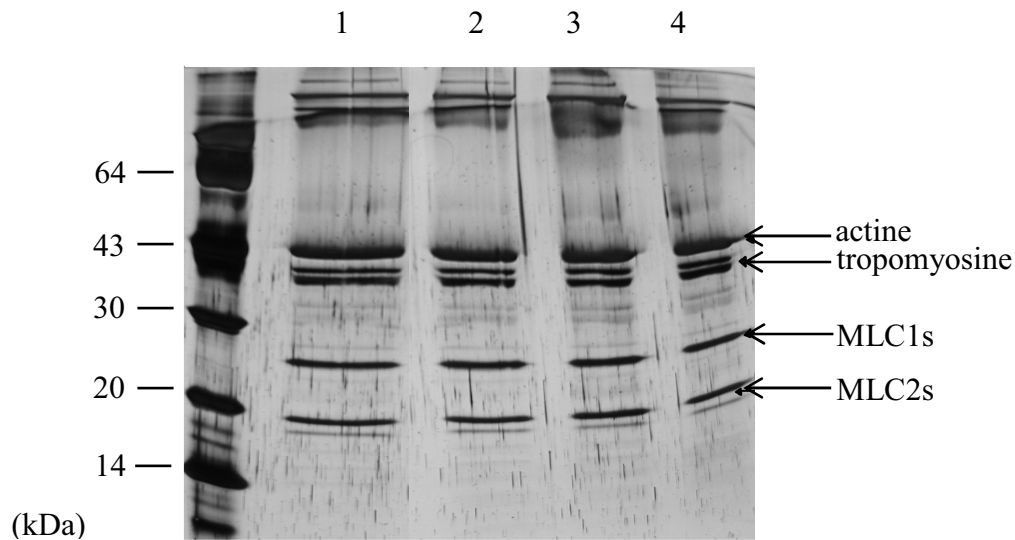


Figure 51 : Profil électrophorétique de fibres musculaires contrôle (en 1), ou incubées dans une solution de GalNAc 0,2 M (en 2), de GlcNAc 0,2 M (en 3) ou de glycérol 0,2 M (en 4).

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.

II – C. Rôles des motifs O-GlcNAc « libres » dans les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires.

Pour masquer les motifs O-GlcNAc libres, nous avons incubé les fibres pelées avec 0,5 mg/mL de WGA. 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). D'autre part, des expériences réalisées à 0,02 mg/mL de WGA ne montraient pas d'effets reproductifs. Afin de montrer la spécificité de l'effet observé, nous avons réalisé des expériences en présence de WGA dénaturée (figure 52) ou de WGA saturée par une préincubation en présence de GlcNAc à 0,02 M (figure 53). Des expériences ont été réalisées en présence d'une autre lectine, la concavaline. Un déplacement de la courbe T/pCa vers de plus fortes affinités calciques est alors observé. La concavaline est spécifique du motif α -D-mannose.

Les relations Tension/pCa résultantes de cette étude sont représentées sur les figures 52

et 53 et les valeurs de seuil d'activation calcique, la pCa_{50} , et les coefficients de Hill représentatives de deux fibres sont indiqués dans le tableau XVI.

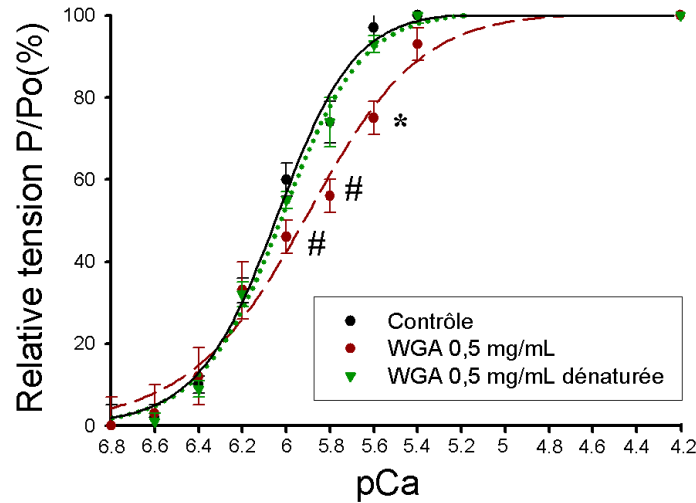


Figure 52 : Relation T/pCa des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de WGA à 0,5 mg/mL. $n=10$.

* $p < 0,05$ WGA 0,5 mg/mL vs Contrôle.

$p < 0,01$ WGA 0,5 mg/mL vs Contrôle.

Tableau XVI : Détermination du seuil d'activation, de la pCa_{50} et de la coopérativité après une incubation dans une solution de WGA 0,5 mg/mL ($n=10$).

	Cont	WGA
pCa_{50}	6.05 ± 0.02	5.93 ± 0.06 #
n_H	2.94 ± 0.15	2.03 ± 0.23

$p < 0,01$ WGA 0,5 mg/mL vs Contrôle.

L'analyse de l'effet de la WGA montre qu'en présence de 0.5 mg/mL de WGA les fibres présentent une diminution de leur affinité calcique attestée par une diminution de la pCa_{50} . Le seuil calcique ne semblerait pas être modifié. L'effet de la WGA sur l'affinité calcique est spécifique puisque lorsque celle-ci est dénaturée, aucun effet n'est observé (figure 52). Si la WGA est préincubée en présence d'une concentration saturante de GlcNAc (0,02

M), elle ne produit plus aucun effet sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires (figure 53).

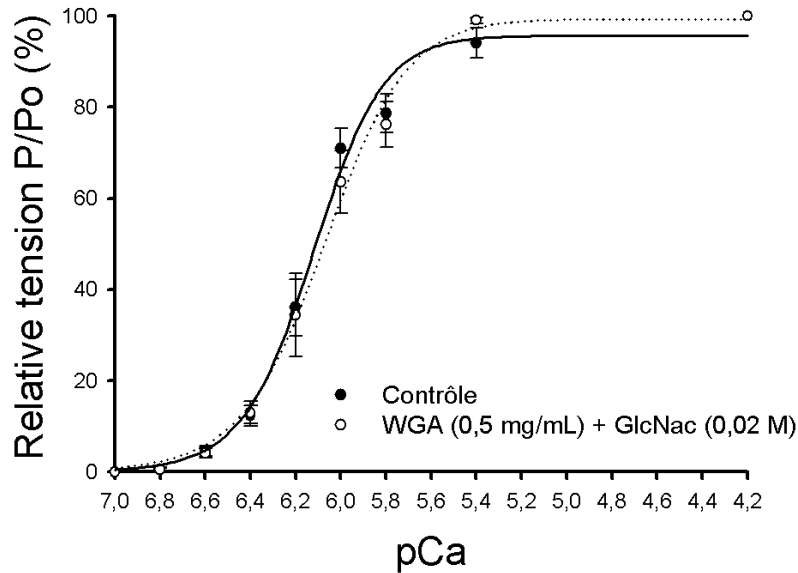


Figure 53 : Relation *T/pCa* des fibres musculaires après une incubation d'une heure dans une solution de WGA à 0,5 mg/mL préincubée dans 0,02 M de GlcNAc. *n*=10.

III – 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-acétyl-glucosaminylée de ces protéines a été confirmée par immunoblot à l'aide d'un anticorps spécifique du motif *O*-GlcNAc mais également par chromatographie en phase gazeuse (GC et GC-MS), grâce à l'analyse des alditols acétates libérés des protéines d'intérêt par β -élimination en milieu réducteur. Puisque ces protéines sont également retrouvées dans les lavages des colonnes de WGA-immobilisées, seulement une partie de ces protéines sont modifiées par la *O*-GlcNAc. Cependant, la fraction de chaque protéine présentant la

modification n'est pas négligeable. Certaines de ces protéines telles que la MLC₁ et la MLC₂ sont aussi des phosphoprotéines. En effet, 30% des MLC₂ lentes et rapides sont phosphorylées dans le soleus et l'EDL (Bozzo et coll., 2003). Le niveau endogène de phosphorylation des MLC est crucial pour la sensibilité calcique. De plus, l'augmentation de la phosphorylation des MLC est associée à une transition lente vers rapide dans le soleus atrophié de rat (Bozzo et coll., 2003). Ces résultats montrent que ces modifications post-traductionnelles peuvent jouer un rôle important même si seulement une partie de la protéine présente cette modification. Nos résultats démontrent que les principales protéines constitutives du filaments fin et du filaments épais sont *O*-GlcNAcylées, ce qui pourrait suggérer que la *O*-GlcNAc soit impliquée dans la polymérisation de l'actine et de la myosine comme cela a déjà été démontré pour le neurofilament (Wong et Cleveland, 1990) ou dans la modulation des interactions protéiques comme par exemple entre la MHC et les MLC et ainsi moduler les propriétés d'activation calciques des fibres musculaires. 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. Par conséquent, nous avons étudié les propriétés d'activation calciques des fibres musculaires en présence de GlcNAc pour déterminer si des interactions à travers cette modification post-traductionnelle pourraient être impliquées dans la physiologie contractile. Les expériences étant réalisées sur des fibres pelées qui ont perdu leurs composants intracellulaires libres, l'effet de la GlcNAc ne peut pas être attribué à une augmentation de la glycosylation à travers l'activation de la *O*-GlcNAc transférase mais plus vraisemblablement par une levée d'interaction protéine-protéine mettant en jeu le motif *O*-GlcNAc. Nous avons utilisé de la GlcNAc à une concentration de 0,2 M car cette concentration est suffisante pour éluer les protéines retenues sur colonne de WGA-immobilisée et donc permet de supprimer les interactions protéine-protéine qui mettent en jeu le motif *O*-GlcNAc. Nous avons démontré ainsi que la GlcNAc permet une diminution de la sensibilité et de l'affinité calciques sans modifier la coopérativité des protéines au sein du filament fin. Ni le glycérol, ni le sucrose, ni même la GalNAc ne reproduisent cet effet. Ceci indique que cette diminution de la sensibilité calcique n'est pas une conséquence de l'hyperosmolarité et est spécifique de la GlcNAc. Il semble donc que l'effet observé résulte d'une levée d'interaction protéine-protéine mettant en jeu le motif *O*-GlcNAc. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un effet spécifique de la GlcNAc par un mécanisme inconnu impliqué dans le développement de la contraction musculaire. La diminution de la sensibilité calcique ne peut pas être due à une perte de protéines puisque le pattern électrophorétique n'est pas modifié en présence de GlcNAc. Cette observation pourrait expliquer la réversibilité

de l'effet de la GlcNAc : après lavage, les protéines peuvent de nouveau interagir entre elles grâce au motif *O*-GlcNAc. La diminution de la sensibilité et de l'affinité calciques en présence de la GlcNAc pourrait induire une perte de force de contraction. Nos résultats suggèrent donc que la *O*-GlcNAc pourrait être impliquée dans la modulation de la force dans le muscle squelettique à travers une modulation des interactions protéine-protéine. Ainsi, des variations du niveau de glycosylation des protéines contractiles pourraient jouer un rôle dans la modulation de la force dans le muscle squelettique. Une diminution du taux de *O*-GlcNAc est observée dans le muscle soléaire atrophié (Cieniewski-Bernard et coll., 2006). Cette diminution pourrait être impliquée dans la perte de force observée dans le muscle atrophié. La troponine C (TnC), une sous unité du complexe des troponines, agit comme un détecteur de calcium. Elle module les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires, plus particulièrement la pCa_{50} (Pol-Rodriguez et coll., 2001 ; Moss et coll., 1986 ; Szczesna et coll., 1996a). La TnC pourrait donc être impliquée dans les effets observés en présence de GlcNAc. Cependant, nous n'avons pas été capables de déterminer si la TnC est *O*-GlcNAcylée ou pas. Le faible niveau d'expression des troponines et leur niveau de migration proche de certaines protéines contractiles majoritaires, rend leur détection difficile après une coloration classique sur un gel SDS-PAGE.

Il a été montré que la perte de la MLC_2 pourrait diminuer la sensibilité calcique (Szczesna et coll., 1996b). Puisque nous avons montré que la MLC_2 et la MHC étaient *O*-GlcNAcylées, la diminution de la sensibilité calcique en présence de GlcNAc, pourrait être due à une levée d'interaction entre la MHC et la MLC_2 mettant en jeu la *O*-GlcNAc. Ainsi, il a été démontré que la MHC de lapin pourrait être phosphorylée par la caséine kinase II après retrait de toutes les chaînes légères de myosine (Murakami et coll., 1988). Ces auteurs proposent que beaucoup de ces sites phosphorylés puissent être initialement occupés par la *O*-GlcNAc.

Certaines protéines identifiées comme *O*-GlcNAc dans ce travail, sont aussi des phosphoprotéines. En particulier, la MLC_2 est phosphorylée *in vivo* par la MLCK ou Myosin Light Chain Kinase. Dans le muscle squelettique, les sites de phosphorylation de la MLC_2 sont localisés sur la sérine 14 pour l'isoforme lente et la sérine 15 pour l'isoforme rapide (Blumenthal et coll., 1980). Cette phosphorylation augmenterait la sensibilité calcique des fibres musculaires (c'est-à-dire déplacement de la relation T/pCa vers la gauche) (Persechini et coll., 1985 ; Metzger et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1993 ; Szczesna et coll., 2002). Le niveau de phosphorylation endogène des MLC semble être en effet un déterminant crucial pour la sensibilité calcique du développement de la force. La glycosylation de la MLC_2

pourrait s'opposer aux effets de cette phosphorylation et diminuer la sensibilité calcique des fibres musculaires. La phosphorylation de la MLC_2 a également un rôle structural puisqu'elle contribue à l'assemblage des filaments myofibrillaires. Durant la fibrillogénèse, la MLCK phosphoryle les MLC, permettant ainsi l'assemblage du filament épais (Terry et coll., 2006). Nous pouvons donc supposer que la balance glycosylation/phosphorylation de la MLC_2 puisse être impliquée dans la modulation de l'assemblage de la myosine. L'identification des sites *O*-GlcNAc pourrait permettre de comprendre comment la phosphorylation et la glycosylation peuvent moduler l'activité de la MLC_2 .

Il semblerait que les motifs *O*-GlcNAc libres jouent également un rôle important dans la régulation de la contraction musculaire puisque lorsqu'ils sont masqués par une lectine, la WGA, l'affinité calcique des fibres musculaires diminue. La présence de WGA pourrait empêcher des interactions lectiniques dont le rôle serait important dans les propriétés d'activation calcique.

En conclusion, nos résultats montrent clairement que la *O*-GlcNAc libre ou engagée dans des interactions protéiques, joue un rôle dans l'activité contractile du muscle squelettique. Ces travaux montrent donc pour la première fois, un rôle potentiel de la *O*-GlcNAc dans la régulation de l'activité contractile.

Partie II

*Identification des sites O-GlcNAc
par une approche biochimique, la
BEMAD.*

I. Problématique

Nous avons démontré par une analyse protéomique que beaucoup de protéines dans le muscle squelettique étaient modifiées par la *O*-GlcNAc (Cieniewski et coll., 2004) et en particulier des protéines contractiles clés telles que l'actine, la MHC et les MLC (Hédou et coll., 2007). Nous avons également montré que le motif *O*-GlcNAc entrant dans des interactions protéine-protéine, comme les motifs *O*-GlcNAc libres pouvaient moduler les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires (Hédou et coll., 2007).

Il a été montré que la *O*-GlcNAc agissait de manière analogue à la phosphorylation et pouvait même moduler les états de phosphorylation d'une protéine (Cheng et coll., 2000 ; Comer et coll., 2001 ; O'Donnell et coll., 2004). Beaucoup de protéines contractiles identifiées comme étant *O*-GlcNAcylées, sont des phosphoprotéines. La phosphorylation de l'actine est un processus clé dans la formation de l'actine filamenteuse (Egelman et Orlova, 1995). De plus, il est bien connu que la phosphorylation des MLC₂ est un modulateur important du développement de la force de contraction (Gordon et coll., 2000). La phosphorylation de la MLC₂ est capable de moduler l'interaction actine-myosine (Perrie et coll., 1973) et augmente la sensibilité calcique des fibres musculaires.

L'objectif de cette étude est de comprendre comment la *O*-GlcNAc peut moduler l'activité contractile des fibres musculaires et de déterminer si une balance entre la glycosylation et la phosphorylation pourrait exister et moduler les fonctions des protéines contractiles. L'analyse des sites de modifications post-traductionnelles est devenue un challenge extrêmement important pour comprendre le rôle qu'elles peuvent jouer dans l'activité des protéines. Pour répondre à ces questions, nous avons fait une analyse des sites *O*-GlcNAc sur les protéines contractiles. L'analyse directe des sites *O*-GlcNAc par spectrométrie de masse est difficile car la liaison *O*-GlcNAc est labile et peut se casser dans la chambre de collision (Greis et coll., 1996 ; Haynes et coll., 2000 ; Chalkley et coll., 2001). Nous avons donc voulu utiliser une technique appelée BEMAD. Cette technique consiste à remplacer les motifs *O*-GlcNAc par du DTT. Les peptides-DTT sont ensuite enrichis. La liaison DTT étant stable, nous pouvons identifier les sites *O*-GlcNAc par LC-MS/MS (Wells et coll., 2002a). Nous utilisons cette méthode sur les protéines contractiles du muscle squelettique de rat.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication sous presse à *proteomics* dont le titre est Mapping of O-linked β -N-Acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle (Hédou J, Bastide B, Page A, Michalski and Morelle W).

II. Les résultats

1) Enrichissement des protéines contractiles

Tout d'abord, les protéines contractiles sont enrichies à partir d'un extrait total de soleus comme décrit précédemment (chapitre IV, partie I, II, A, 1). Ensuite, les protéines sont analysées *via* un gel SDS-PAGE 10-20 % (figure 54 A). Comme attendu, les protéines majoritaires correspondent aux chaînes lourdes et légères de myosine (MHC, MLC₁ et MLC₂), aux isoformes de tropomyosine et à l'actine. La O-GlcNAcylation de ces protéines est ensuite confirmée par western blot en utilisant la WGA peroxydase (figure 54 B) et un anticorps monoclonal dirigé contre la O-GlcNAc (RL-2, Ozyme) (figure 54 C). Le même pattern de protéines identifiées comme O-GlcNAc est obtenu avec les deux protocoles. De plus, l'incubation du RL-2 ou de la WGA peroxydase avec 0,5 M de GlcNAc libre inhibe la détection des protéines contractiles (figure 54 D).

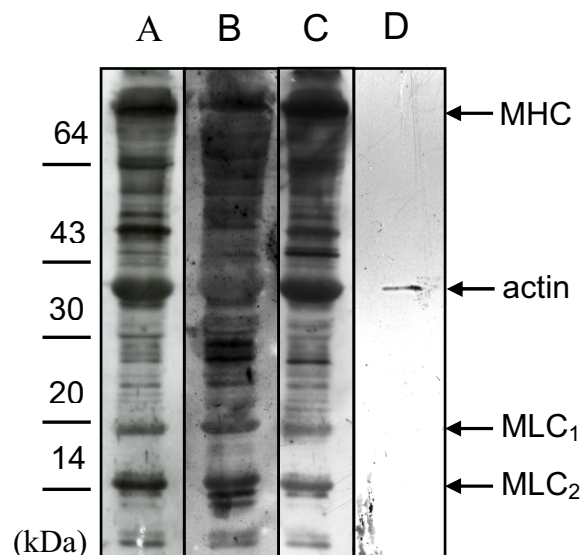


Figure 54 : *Electrophorèse monodimensionnelle des protéines contractiles de soleus. Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 10-20 % et révélées au nitrate d'argent (A) ou par western blot en utilisant la WGA peroxydase (B), un anticorps anti-O-GlcNAc (C), ou le même anticorps anti-O-GlcNAc en présence de 0,5 M de GlcNAc libre (D).*

2) Stratégie d'identification des sites *O*-GlcNAc par une approche biochimique : la BEMAD (figure 55)

La stratégie employée pour l'identification des sites *O*-GlcNAc est schématisée dans la figure 55. Elle est appliquée à un mélange de protéines contractiles. Elle consiste à remplacer la liaison *O*-GlcNAc qui est labile et libérée aux basses énergies de collision lors de l'analyse en MS, par une liaison stable, le DTT. Cette technique appelée BEMAD, nécessite tout d'abord, l'oxydation des résidus cystéines réalisée par une oxydation performique. En effet, les cystéines alkylées sont susceptibles de lier le DTT. Les protéines sont ensuite digérées par une incubation en présence de trypsine (Wells et coll., 2002a). Après oxydation, digestion trypsique et le traitement à la phosphatase (pour supprimer tous les sites de phosphorylation susceptibles de lier un DTT), la BEMAD est réalisée. Les peptides sont ensuite purifiés sur Sep Pack C₁₈ et les peptides modifiés par le DTT sont enrichis par une chromatographie d'affinité sur colonne de Thiol Sepharose. Après purification sur Sep Pack C₁₈, les peptides enrichis sont analysés en LC-MS/MS. Le DTT ajoute un incrément de masse de 136.2 kDa sur les résidus sérine et thréonine, ce qui nous permet d'identifier les sites modifiés par le DTT et donc initialement modifiés par la *O*-GlcNAc. Pour s'assurer que la BEMAD ne se fasse pas sur des résidus de sérine et de thréonine non modifiés, des contrôles après traitement à la β -hexosaminidase, ont été réalisés afin d'ôter toutes modifications *O*-GlcNAc sur les protéines. Il est important de noter que ces expériences sont réalisées sur plusieurs échantillons et seules les séquences peptidiques identifiées plus de deux fois sont présentées dans ce travail.

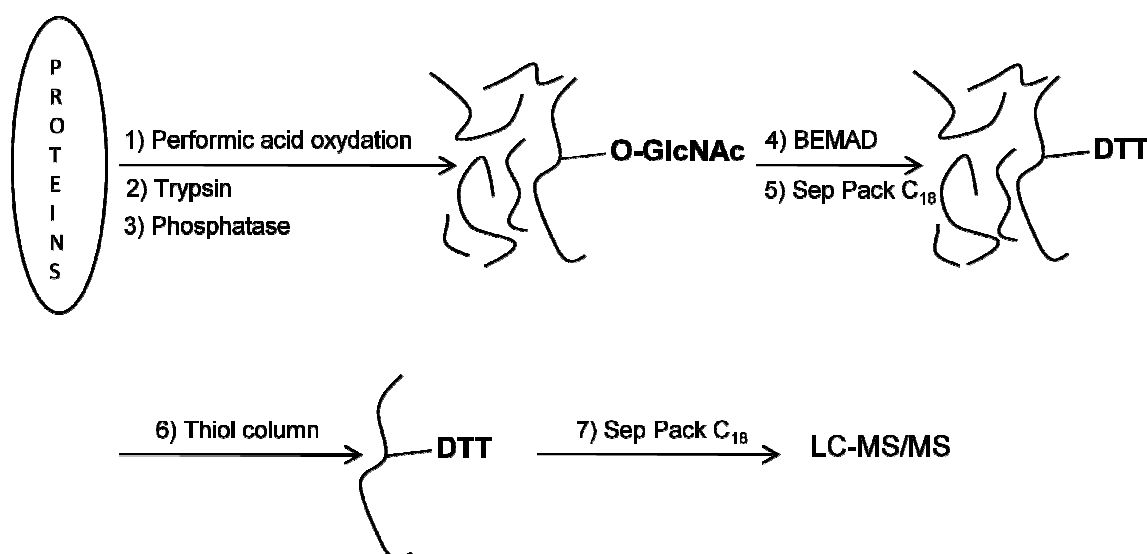


Figure 55 : Stratégie dévouée à l'identification des sites *O*-GlcNAc sur les protéines contractiles.

3) Sites O-GlcNAc

Les analyses LC-MS/MS des peptides résultant de l'oxydation performique, la digestion trypsique, le traitement à la phosphatase (pour supprimer les phosphates susceptibles de capter le DTT), la BEMAD et l'enrichissement par chromatographie d'affinité sur colonne thiol, identifient plusieurs peptides présentant un motif DTT. Les données sont analysées en utilisant les banques de données de MASCOT et vérifiées manuellement. De plus, puisque l'oxydation performique cible non seulement les résidus cystéiques mais aussi les méthionines, les tryptophanes et les histidines, les modifications dues à l'oxydation de ces résidus sont aussi prises en compte dans les interprétations des spectres MS/MS. Pour tous les peptides, les données MS/MS sont de qualité suffisante pour déterminer sans ambiguïté les sites modifiés par la O-GlcNAc.

Un ion monochargé à m/z 1266.9 qui est entouré sur le spectre Maldi (figure 56 A), est fragmenté en MS/MS. Il correspond à l'ion précurseur dichargé élué à 23.97 min (figure 56 B) et à m/z 633.9. Le spectre MS/MS est caractérisé par deux séries d'ions : les ions fragments y et les ions de type b qui permettent d'identifier une sérine modifiée par la O-GlcNAc dans la séquence peptidique GY(S-DTT)FVTTAER. La localisation de la sérine modifiée par la O-GlcNAc est basée sur la présence l'ion y7 sans DTT à m/z 823.4 et de l'ion y8 avec un DTT à m/z 1046.2. L'analyse par appariement de cette séquence, en utilisant le logiciel NCBI Blast de EXPASY, permet de montrer que ce peptide correspond à une séquence de l'actine. Ce peptide n'est pas retrouvé après le traitement à la β -hexosaminidase (figure 56 C), le site trouvé est donc bien un site O-GlcNAc.

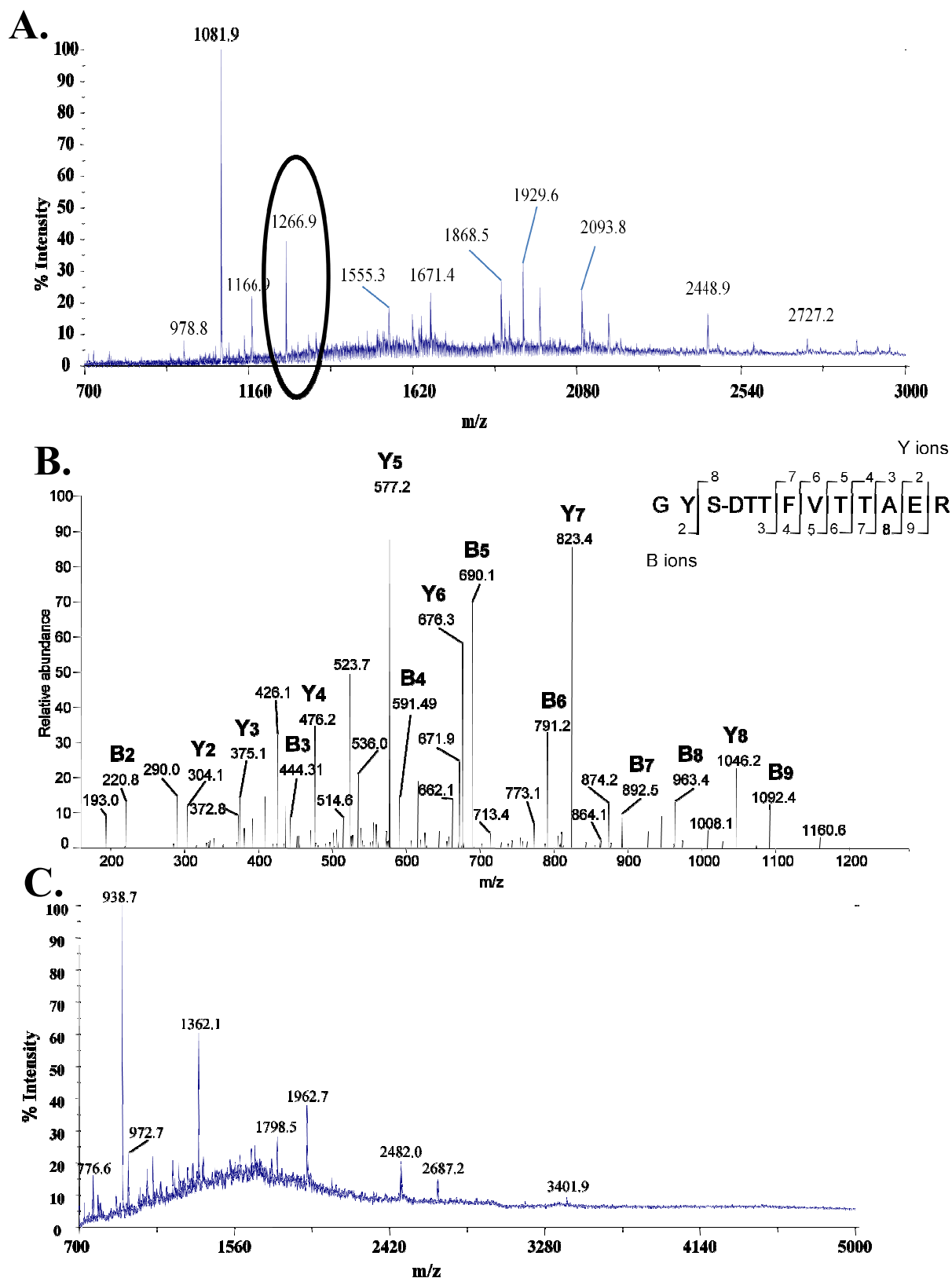


Figure 56 : Séquençage d'un peptide DTT après Bemad. A. Profil MS des peptides DTT enrichis après BEMAD. B. Fragmentation MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 633.9 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de GY(S-DTT)FVTTAER possédant un DTT sur la sérine 200. C. Profil MS des peptides DTT traités à la β -hexosaminidase puis enrichis après BEMAD.

Deuxième partie : Identification des sites O-GlcNAc par une approche biochimique, la BEMAD.

Dans la figure 57, sont représentés les spectres MS/MS de deux ions dichargés à m/z 798.8 et de temps de rétention 28.59 min (figure 57 A) et à m/z 835.5 et de temps de rétention 29.51 min (figure 57 B), respectivement. Le spectre MS/MS de l'ion à m/z 798.8, identifie le peptide IEDEQALG(S-DTT)QLQK avec un DTT sur la sérine (figure 57 A). La localisation de la sérine modifiée par la *O*-GlcNAc est basée sur la présence de l'ion b8 sans DTT à m/z 856.1 et de l'ion b9 avec un DTT à m/z 1080.2. L'ion y3 sans DTT à m/z 388.2 et de l'ion y5 avec le DTT à m/z 739.3 confirme la localisation de la sérine modifiée par le DTT. Dans la figure 57 B, le spectre MS/MS de l'ion à m/z 835.5 identifie le peptide VVD(S-DTT)LQTSLDAETR avec un DTT sur une sérine. Dans ce peptide, deux thréonines et deux sérines sont présentes. La présence des ions y2 à y10 sans DTT rend possible l'identification de la sérine modifiée par la *O*-GlcNAc. Ces peptides ont été identifiés comme correspondant à deux séquences de la chaîne lourde de myosine (MHC).

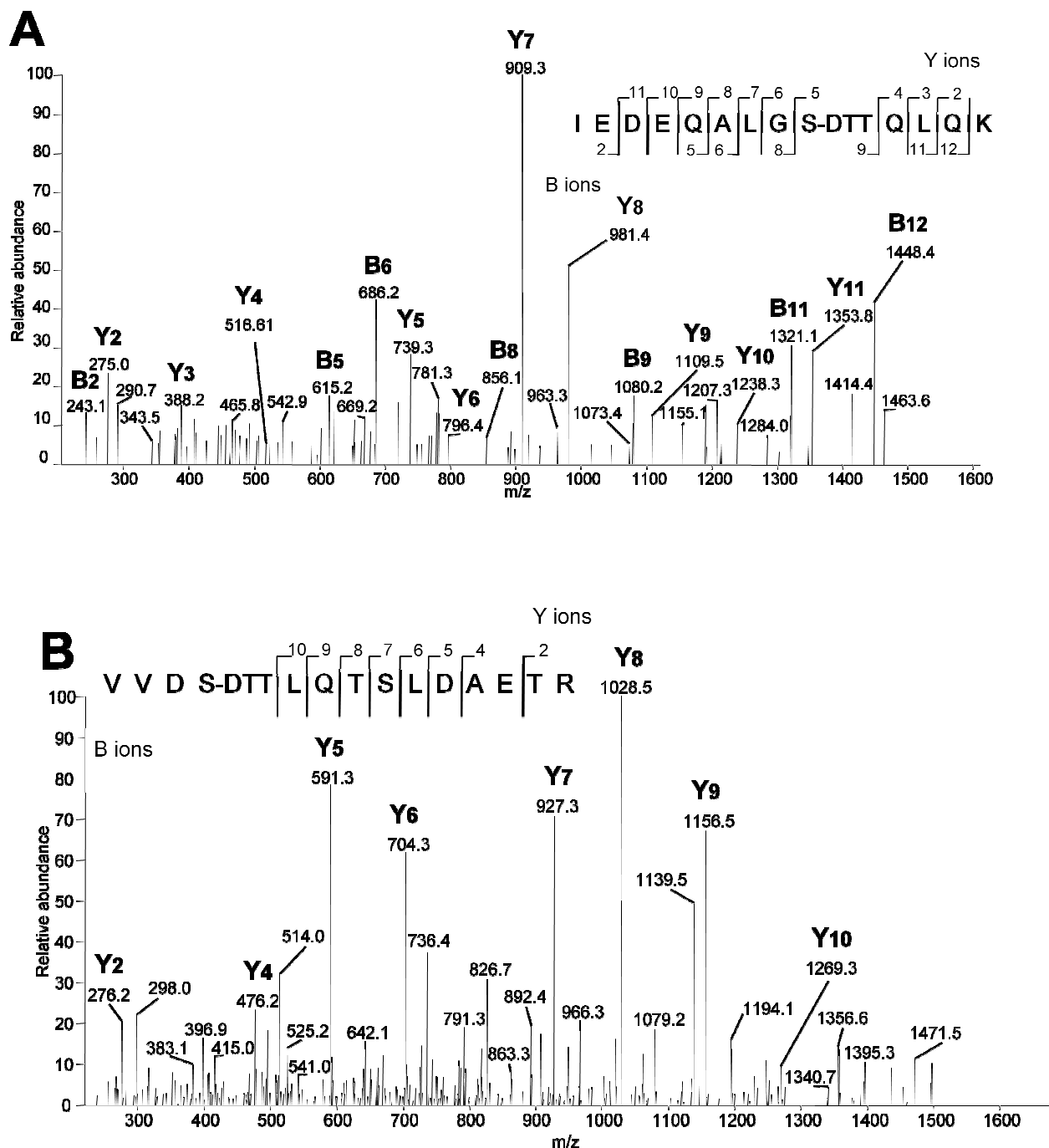


Figure 57 : A. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 798.8 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de IEDEQALG(S-DTT)QLQK possédant un DTT sur la sérine 1708. B. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 835.5 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de VVD(S-DTT)LQTSLEAETR possédant un DTT sur la sérine 1097.

Dans la figure 58, sont représentés les spectres MS/MS de deux ions dichargés à m/z 778.3 et de temps de rétention 36.17 min (figure 58 A) et à m/z 584.2 et de temps de rétention 39.44 min (figure 58 B), respectivement. Le spectre MS/MS de l'ion à m/z 773.8 identifie le peptide LAEQELIET(S-DTT)ER avec un DTT sur la sérine (figure 58 A). La localisation de la sérine modifiée par la O-GlcNAc est basée sur la présence de l'ion y_2 sans DTT à m/z 304.0, de l'ion y_3 avec un DTT à m/z 527.2, de l'ion b_9 sans DTT à m/z 1027.9.2 et de l'ion b_{10} avec un DTT à m/z 1251.5. Dans la figure 58 B, le spectre MS/MS de l'ion à m/z 584.2 identifie le peptide EALI(S-DTT)QLTR avec un DTT sur une sérine. La localisation de la sérine modifiée par la O-GlcNAc est basée sur la présence de l'ion y_4 sans DTT à m/z 517.4, de l'ion y_5 avec un DTT à m/z 740.3, de l'ion b_4 sans DTT à m/z 427.1 et de l'ion b_5 avec un DTT à m/z 650.2. Ces peptides correspondent à deux séquences de la chaîne lourde de la myosine (MHC).

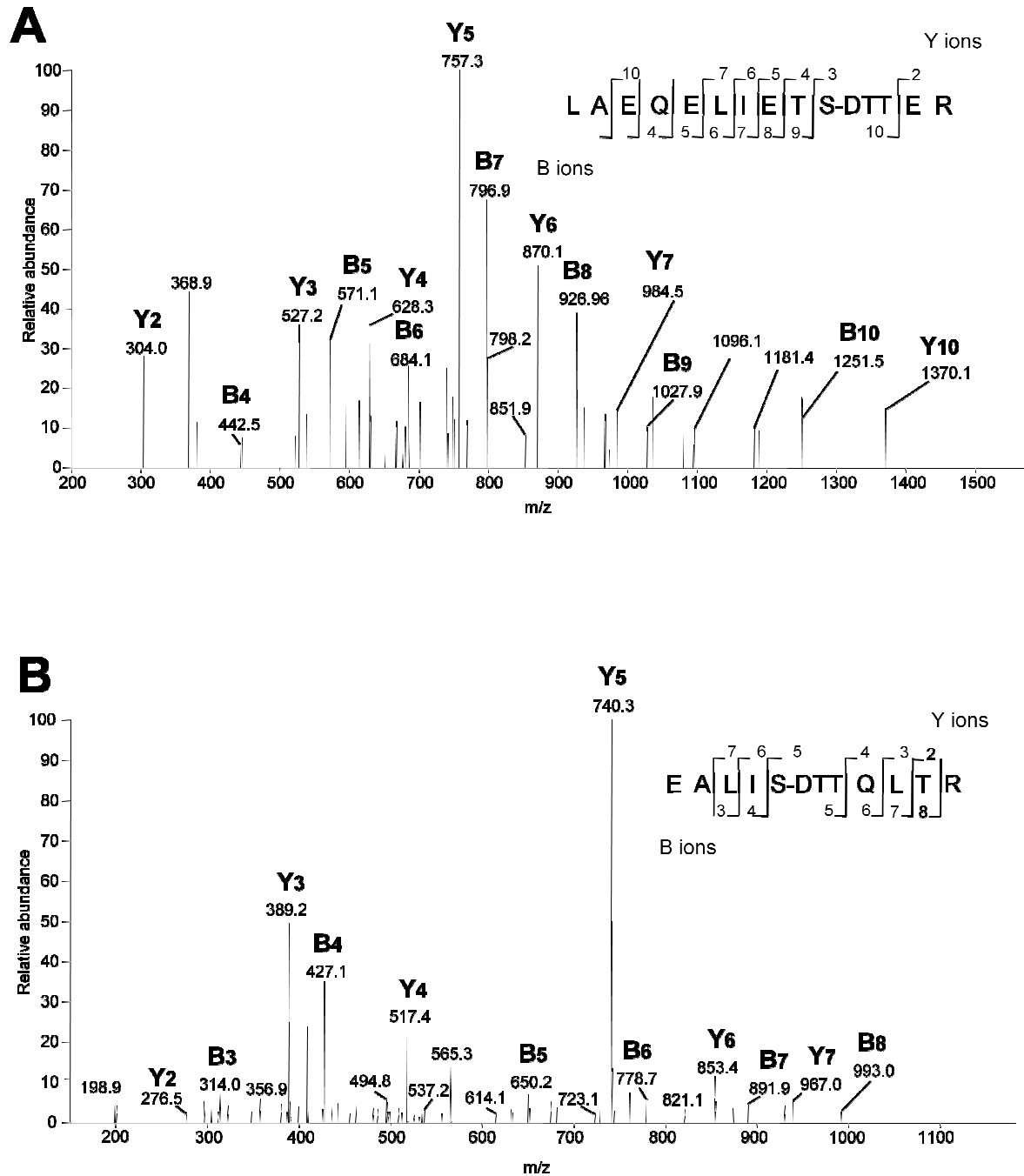


Figure 58 : A. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 778.3 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de LAEQELIET(S-DTT)ER possédant un DTT sur la sérine 1920. B. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ à m/z 584.2 avec les ions fragments y et b permettant l'identification de EALI(S-DTT)QLTR possédant un DTT sur la sérine 1299.

Deuxième partie : Identification des sites O-GlcNAc par une approche biochimique, la BEMAD.

Dans le tableau XVII, nous avons récapitulé l'ensemble des sites O-GlcNAc identifiés sur les protéines contractiles du soleus grâce à la BEMAD.

Table XVII:
Peptide identifications derived from the BEMAD analysis of contractile proteins.

LC-MS/MS analysis of peptide digests resulting from performic acid oxidation, trypsin digestion, phosphatase treatment, BEMAD labeling with dithiothreitol, and thiol affinity chromatography identified several peptides with a DTT tag. The data were analyzed using the Mascot database and manual inspection allowing for serine and threonine residues to be modified by 136.2 daltons. z, charged state; Xcorr, confidence score for peptide identification.

Z	Predicted MH ⁺	Observed MH ⁺	Xcorr	Matched ions	Protein	Peptide sequence
2	1165.68	1166.44	53	12/18	MHC	EALI(S- DTT)QLTR 1295 1303
2	1552.81	1553.99	71	14/24	MHC	LAEQELIET(S- DTT)ER 1913 1922
2	1593.84	1594.32	80	14/26	MHC	IEDEQALG(S- DTT)QLQK 1701 1712
2	1668.87	1669.11	69	8/28	MHC	VVD(S- DTT)LQTSLDAETR 1094 1106
2	1265.64	1266.19	59	15/20	Actin	GY(S- DTT)FVTTAER 198 207

Les analyses LC/MS-MS des autres peptides DTT enrichis sur colonne thiol après oxydation performique, digestion trypsique, traitement à la phosphatase et à la β -hexosaminidase et BEMAD, n'ont pas permis de faire une identification définitive de ces peptides DTT (résultats non montrés). Nous pouvons donc conclure que la sérine 200 de l'actine et les sérines 1299, 1920, 1708 et 1097 de MHC sont O-GlcNAcylées. Il est probable que d'autres sites O-GlcNAc soient présents sur la MHC, les MLC, l'actine et les isoformes de tropomyosine. L'amélioration de la préparation des échantillons protéiques pourrait nous aider à les identifier.

III. Discussion

Grâce à la BEMAD, nous avons identifié plusieurs sites *O*-GlcNAc sur deux protéines clés de la machinerie contractile du muscle squelettique, l'actine et la myosine. Un site a été localisé sur la séquence 198-207 de l'actine et quatre autres ont été identifiés dans la partie hélicoïdale de la région carboxy-terminale de la myosine et correspondent aux séquences 1094-1106 ; 1295-1303 ; 1701-1712 ; 1913-1922. En considérant la localisation de ces sites, nous pouvons proposer des fonctions spécifiques à la *O*-GlcNAc.

La myosine (figure 59) convertit l'énergie chimique en énergie mécanique grâce à ses deux sous-unités appelées MHC (Myosin Heavy Chain) (Gordon et coll., 2000). Dans la région N-terminale de la molécule, ces sous-unités se composent d'un domaine globulaire dit S1 qui est le domaine moteur de la molécule. Au niveau C-terminal de la molécule, ces deux sous-unités s'enroulent en double hélice, constituant ainsi une structure rigide correspondant à la queue de la myosine. Par digestion protéolytique, on peut cliver la protéine en deux parties : la région HMM (heavy meromyosin) qui comprend le domaine S1 et un fragment S2 qui relie S1 au reste de la molécule. La seconde partie est appelée LMM (light meromyosin) et correspond à la portion C-terminale de la queue de la myosine. Les quatre séquences comprenant les sites *O*-GlcNAc sont situées dans cette deuxième partie, ce qui suggère que la *O*-GlcNAc pourrait être impliquée dans les interactions de la myosine avec d'autres protéines. En effet, d'une part, de récents travaux ont démontré que l'une des fonctions de la *O*-GlcNAc est de réguler les interactions protéine-protéine (Ross et coll., 1997 ; Han et coll., 1998 ; Yang et coll., 2001). D'autre part, trois régions de cette LMM ont été identifiées comme impliquées dans des interactions protéine-protéine. Les résidus 1815 à 1831 correspondent à une région liant la myosine à la titine (Houmeida et coll., 1995) et les résidus 1503 à 1671 lient la myosine aux protéines M et à la myoméline (Obermann et coll., 1997). Enfin, les résidus 1874 à 1902, situés à la fin de la partie LMM sont impliqués dans la polymérisation (Sohn et coll., 1997). Comme indiqué dans la figure 63, les sites *O*-GlcNAc identifiés ne correspondent pas précisément aux régions connues pour être directement impliquées dans des interactions protéiques et dans le processus de polymérisation mais sont adjacents à celles-ci. Cependant, la *O*-GlcNAc pourrait moduler la fonction de liaison de ces séquences. Ainsi il a été démontré que la phosphorylation des résidus thréonine 1823 et 1833 était impliquée dans la polymérisation de la myosine bien que ces sites soient situés en dehors de la région directement impliquée. Beaucoup de sites correspondant à des myopathies héréditaires impliquant la myosine, sont localisés dans la région LMM. Ce type de myopathies est causé

par des mutations des gènes codant les MHC dans le muscle squelettique (Oldfors et coll., 2007).

Des mutations ont été trouvées dans deux des trois isoformes de MHC dans le muscle squelettique adulte : la MHC I (isoforme lente ou cardiaque MHY 7) et la MHC IIa (MYH 2). Plusieurs mutations dans la queue de la MHC I sont associées à deux myopathies distinctes : la myopathie distale de Laing et la MSM (myosin storage myopathie). Cette dernière pathologie est caractérisée par une accumulation anarchique de myosine de type I dans les fibres, causant ainsi une altération de l'assemblage du filament. Ces mutations ne sont pas dans des régions connues pour être impliquées dans l'interaction avec la titine et la myoméline ou dans le processus de polymérisation. Il est donc possible que d'autres régions de la LMM que celles décrites actuellement soient impliquées dans la polymérisation ou dans le réarrangement structural. Dans la myopathie distale de Laing, une myopathie caractérisée par une hypotrophie des fibres de type I (Meredith et coll., 2004 ; Laing et coll., 2007), une mutation est trouvée dans une des séquences qui contient un site O-GlcNAc (1701-1712) : il s'agit de la lysine (L1706P), adjacente à la sérine modifiée par la O-GlcNAc. Comme il a été montré que les mutations de la MHC I qui causent la myopathie distale de Laing pourraient perturber la liaison de la myosine à la titine, à la myoméline ou à la protéine M, cette localisation du site O-GlcNAc au niveau d'une région impliquée dans cette pathologie conforterait l'idée d'un rôle possible de la O-GlcNAc dans des processus d'interactions protéine-protéine.

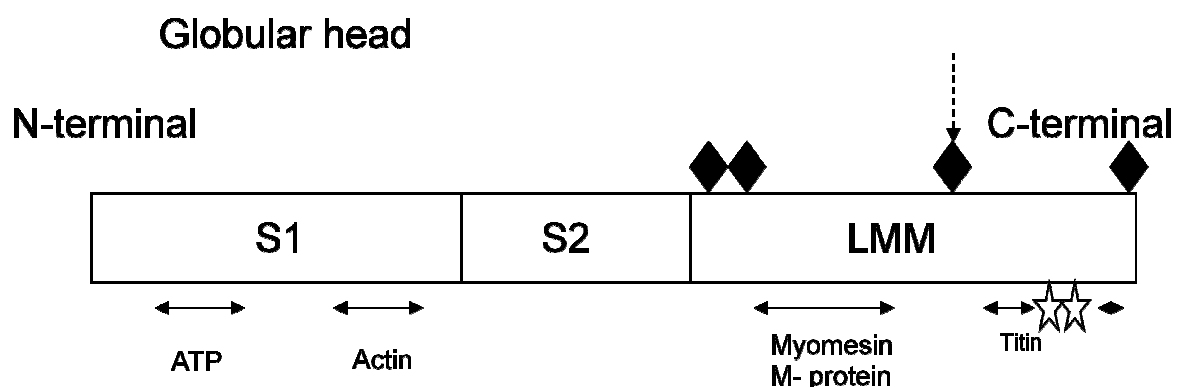


Figure 59: Sites de la myosine avec l'ATP, l'actine, la myoméline 1, la protéine M et la titine. Les sites de phosphorylation sont indiqués par une étoile (*). La mutation L17006P responsable de la myopathie distale de Laing est indiquée par une flèche et les sites O-GlcNAc par un losange (♦).

La seconde protéine pour laquelle un site O-GlcNAc a été identifié correspond à l'actine (figure 60). Celle-ci se présente sous la forme monomérique et se polymérise spontanément en actine filamentaire appelée actine F. L'actine monomérique est composée de quatre sous-domaines qui entourent le domaine de liaison à un ion divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) et à un nucléotide (ATP ou ADP) qui jouent un rôle crucial dans la polymérisation de l'actine et la structure du filament fin (Orlova et coll., 1993). Le site O-GlcNAc identifié, concerne la séquence 198-207 qui est une région commune à la séquence 203-216 qui interagit avec la tropomyosine (Tm) au niveau du sous-domaine 4. Six autres sites putatifs de l'actine correspondent à des régions qui contrôlent la position « on » de la tropomyosine (Lorenz et coll., 1995). L'interaction actomyosine qui est un processus clé dans l'activité contractile, est modulée par la tropomyosine en fonction du calcium qui se fixe sur la troponine C (TnC) (Godon et coll., 2000). Le mouvement de la tropomyosine est induit par le changement de conformation des troponines suite à la liaison du Ca^{2+} sur la TnC. Ce changement de conformation de la Tm de la position « off » à la position « on » va libérer des sites d'interaction entre l'actine et la myosine et favorise ainsi l'interaction actomyosine. Nous pourrions suggérer que le site modifié par la O-GlcNAc serait impliqué dans l'interaction entre l'actine et la tropomyosine. Beaucoup d'interactions protéiques avec l'actine sont soit électrostatiques ou hydrophobiques. La liaison de l'actine à la tropomyosine est électrostatique (Hill et coll., 1992 ; Willadsen et coll., 1992). Ainsi, la tropomyosine est hautement négative et est associée à l'actine dans une région chargée positivement (Lorenz et coll., 1995). La O-GlcNAc ne présentant pas de charge nette, sa présence pourrait cependant modifier localement la disponibilité des charges électrostatiques impliquées dans l'interaction actine-tropomyosine. Les altérations de l'interaction actine-tropomyosine peuvent moduler les propriétés contractiles des fibres pelées. Ainsi, des modifications de la sensibilité et de l'affinité calcique ont été démontrées en fonction de l'expression des différents isoformes de la tropomyosine (Schachat et coll., 1987). Il a été démontré que des mutations de la tropomyosine α du muscle squelettique, impliquées dans une cardiomyopathie dilatée (DCM) et des cardiomyopathies hypertrophiques familiales, induisent une diminution de la sensibilité calcique et de la tension (Rajan et coll., 2007). Un mutant de la tropomyosine α rapide, responsable d'une cardiomyopathie hypertrophique familiale, est associé à une augmentation de la sensibilité calcique des fibres pelées squelettiques (Bottinelli et coll., 1998). Si la O-GlcNAc est impliquée dans l'interaction actine-tropomyosine, elle pourrait moduler la

relation T/pCa des fibres pelées. Nous avons montré précédemment qu'en présence de GlcNAc, les propriétés d'activation calcique des fibres pelées sont modifiées, probablement par une inhibition des interactions protéine-protéine mettant en jeu le motif O-GlcNAc (Hédou et coll., 2007). Une altération de l'interaction actine-tropomyosine mettant en jeu la O-GlcNAc pourrait produire ce type d'altération. Cependant, d'autres interactions pourraient être impliquées dans cette diminution de la sensibilité et de l'affinité calcique observée en présence de GlcNAc qui pourrait concerner d'autres protéines régulatrices telles que la MLC₂ ou la TnC.

En conclusion, ce travail a permis l'identification des premiers sites O-GlcNAc sur deux protéines clés de la contraction musculaire. Ces sites pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine et également jouer un rôle dans la modulation des propriétés contractiles du muscle squelettique.

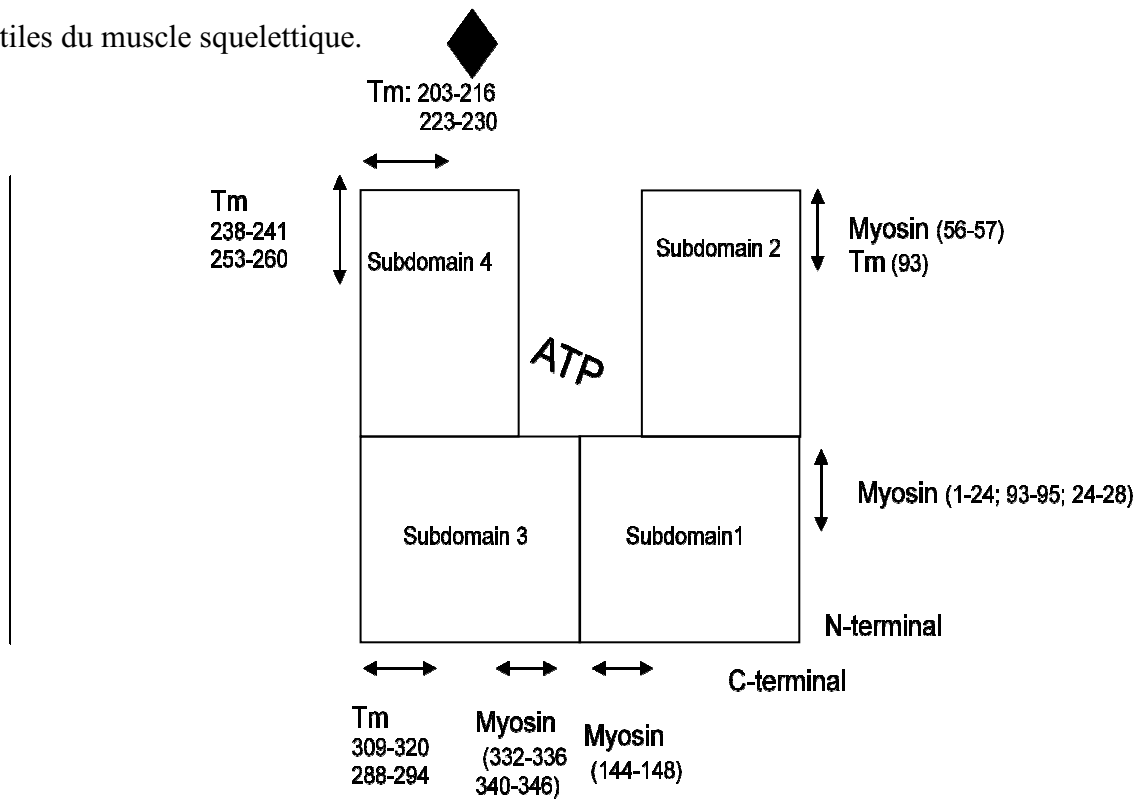


Figure 60: Sites de l'actine avec la myosine et la tropomyosine. Les séquences correspondant aux sites O-GlcNAc sont indiquées par un losange (◆).

Partie III

La O-GlcNAc et l'atrophie musculaire

I. Problématique

De travaux récents réalisés au laboratoire ont montré que la *O*-GlcNAc pouvait être impliquée dans le développement de l'atrophie fonctionnelle. Ainsi parmi les protéines *O*-GlcNAc identifiées dans le muscle squelettique, on trouve des protéines du métabolisme énergétique et des protéines contractiles (Cieniewski-Bernard et coll., 2004). Parmi ces protéines, six marqueurs précoces de l'atrophie musculaire sont modifiés par la *O*-GlcNAc (Cieniewski-Bernard et coll., 2004). Des travaux ont démontré que certains facteurs impliqués dans la voie PI3K-Akt dont l'activation dépend de leur état de phosphorylation, sont des protéines modifiées par la *O*-GlcNAc (Zachara et coll., 2004). Nous avons également montré au laboratoire qu'il existait une corrélation entre les variations du taux global de *O*-GlcNAc et le développement de l'atrophie induite par hypodynamie-hypokinésie (Cieniewski-Bernard et coll., 2006). La perte de masse subie par le soleus durant l'hypodynamie-hypokinésie est accompagnée d'une diminution du taux de *O*-GlcNAc alors que dans l'EDL, qui n'est pas atrophié par l'hypodynamie-hypokinésie, on observe une augmentation du taux de *O*-GlcNAc. De nombreux papiers montrent que la *O*-GlcNAc aurait un rôle protecteur contre le stress cellulaire en mettant en jeu une protéine de choc thermique l'HSP 70. Cette protéine possède une activité lectinique envers la *O*-GlcNAc (Guinez et coll., 2004). Comme les variations de *O*-GlcNAc sont accompagnées d'une même variation de l'expression d'HSP 70, avec une augmentation dans l'EDL, nos résultats suggèrent un rôle de la *O*-GlcNAc dans la régulation de l'atrophie musculaire et la dégradation via le protéasome. Il existerait donc une implication de la *O*-N-acétylglucosaminylation dans le phénomène d'atrophie musculaire. L'ensemble de ces résultats a été obtenu chez le rat.

Nous avons donc entrepris de caractériser le rôle spécifique de la *O*-GlcNAc dans les processus adaptatifs du muscle squelettique atrophié après microgravité simulée chez l'humain. Nous avons utilisé pour cela, un modèle d'altération de la gravité, l'alitement prolongé de deux mois, le bed-rest chez l'humain (Campagne Wise). Deux groupes ont été analysés dans nos travaux : le groupe noté BR qui sert de contrôle d'atrophie musculaire et le groupe noté BR+EXO pour les individus soumis à des exercices physiques durant leur alitement.

Cette étude se fera suivant trois étapes (1) l'analyse de l'effet du bed-rest sur la contraction musculaire ; (2) une étude du rôle des motifs *O*-GlcNAc impliqués dans des

interactions protéine-protéine dans les propriétés de sensibilité calcique et (3) une analyse d'une possible balance glycosylation/phosphorylation qui régulerait l'activité de la MLC₂.

II. Les résultats

II – A. Le bed-rest : un modèle d'atrophie musculaire

1) Caractérisation de l'atrophie

Le tableau XVIII montre les valeurs moyennes des diamètres des fibres lentes et rapides de soleus et de vastus avant et après le bed-rest pour le groupe BR et BR+EXO. Les données de tous les sujets ont été poolées.

Tableau XVIII : Diamètres, forces maximales absolues (Po) et forces spécifiques (Po/CSA) des fibres lentes et rapides de soleus et de VL des groupes BR et BR+EXO avant (PRE) et après (POST) le bed-rest. Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre de fibres. * Différences statiques entre les valeurs PRE et POST BR ($p < 0,05$).

	Slow fibers		Fast fibers	
	PRE	POST	PRE	POST
<u>Groupe BR</u>				
DIAMETERS (μm)				
SOL	93.7 ± 3.2 (59)	75.4 ± 4.1(34)*	97.3 ± 4.4 (28)	84 ± 4 (29)*
VL	92.6 ± 5.1 (54)	68.1 ± 2.3(58)*	87.9 ± 3.5 (49)	66.7 ± 3.1 (50)*
Maximal absolute forces				
Po (mN)				
SOL	1.80 ± (44)	1.19 ± (34)	1.30 ± (28)	1.23 ± (29)
VL	2.02 ± (40)	0.95 ± (40)	1.28 ± (33)	0.95 ± (34)
Po/CSA (kN.m⁻²)				
SOL	271 ± 18	201 ± 18*	214 ± 28	229 ± 18
VL	339 ± 27	271 ± 21*	264 ± 25	268 ± 25
<u>Groupe BR+EXO</u>				
DIAMETERS (μm)				
SOL	99.1 ± 2.4 (69)	91.6 ± 3.3(39)*	96.7 ± 4.9 (34)	88.5 ± 3.5 (36)
VL	91.6 ± 3.5 (61)	87 ± 3.8 (40)	84.6 ± 4.0 (40)	86.3 ± 2.9 (45)
Maximal absolute forces				
Po (mN)				
SOL	1.54 ± (42)	1.58 ± (26)	1.27 ± (24)	1.51 ± (30)
VL	1.88 ± (45)	1.71 ± (40)	1.25 ± (24)	1.36 ± (35)
Po/CSA (kN.m⁻²)				
SOL	219 ± 9.6	206 ± 6.5	183 ± 34	217 ± 12
VL	308 ± 19	282 ± 25	275 ± 20	269 ± 23

Pour les sujets du groupe BR, après le bed-rest, les fibres lentes et rapides d'un même muscle sont atrophiées au même degré et leur diamètre diminue de 18 et 26 % respectivement dans le soleus et le VL. Par ailleurs, après le bed-rest, les forces absolues déclinent significativement dans l'ensemble des muscles (soleus et VL). Cet effet est plus marqué pour les fibres lentes que pour les fibres rapides. Quand ces forces sont exprimées en unité de surface (Po/CSA), elles diminuent pour les fibres lentes de 26 % et 19 % respectivement dans le soleus et le VL. Ce qui n'est pas le cas pour les fibres rapides où $Po/CSA \text{ PRE} = Po/CSA \text{ POST BR}$.

Dans le groupe BR+EXO, la diminution de la taille des diamètres pour les fibres lentes est largement atténuée par rapport au groupe BR (8 % dans le soleus et 3 % dans le VL) et totalement abolie pour les fibres rapides.

L'effet exercice préserve et même augmente les forces absolues et spécifiques des fibres lentes et rapides de l'ensemble des muscles (soleus et VL) même si une légère diminution de 10 % est observée pour les fibres lentes du VL après le bed-rest.

2) Propriétés d'activation calcique des fibres PRE BR et POST BR

Pour le groupe BR, les différents paramètres d'activation calcique ont été déterminés pour le soleus avant et après le bed-rest en établissant des relations Tension/ pCa (figure 61). Ils sont résumés dans le tableau XIX.

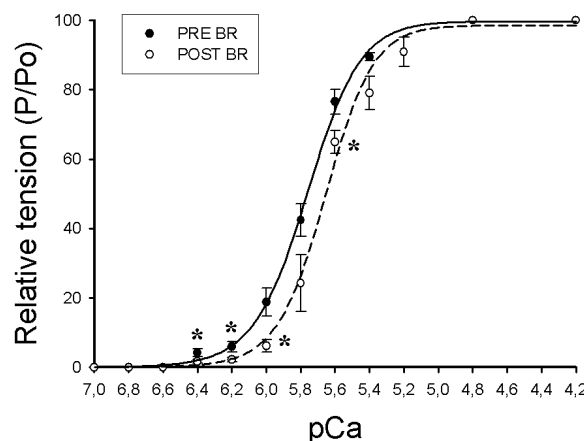


Figure 61: Relation T/pCa des fibres isolées du soleus avant (PRE ●) et après (POST ○) le bed-rest (pour le groupe BR).

Tableau XIX : Paramètres d'activation calciques des fibres POST BR par rapport aux fibres PRE BR du soleus.

* $p < 0,05$.

SOL POST / PRE	
pCa_{thr}	$6.53 \pm 0.11 / 6.73 \pm 0.07^*$
pCa_{50}	$5.65 \pm 0.03 / 5.75 \pm 0.03^*$
n_1	$3.23 \pm 0.42 / 2.60 \pm 0.13$
n_2	$2.83 \pm 0.45 / 2.39 \pm 0.22$

Pour le groupe BR, les fibres POST BR du soleus ont une relation T/pCa qui est shiftée à droite par rapport à la T/pCa PRE BR c'est-à-dire vers des concentrations calciques plus grandes (figure 61) (travaux soumis à publication). Après le bed-rest, les fibres du soleus présentent une diminution de la sensibilité calcique et de l'affinité calcique attestées par une diminution de la valeur du seuil calcique (pCa_{thr}) et de la valeur de la pCa_{50} (Tableau XIX). Par ailleurs, le coefficient de Hill (n_H) et donc la coopérativité des protéines régulatrices au sein du filament fin d'actine n'est pas modifiée après le bed-rest (Tableau XIX).

Chez les sujets du groupe BR, les fibres lentes de VL présentent aussi une diminution de la valeur de la pCa_{50} et de la valeur du seuil calcique. Cependant, contrairement au soleus, la pente de la courbe POST BR est augmentée, la valeur du coefficient de Hill, n_H POST BR étant significativement plus grande que celle en PRE BR.

Les fibres correspondant au groupe BR+EXO ne présentent plus de variations des propriétés d'activation calcique aussi bien pour le soleus que le VL.

3) Rôle de la O-GlcNAc sur les paramètres d'activation calcique des fibres PRE et POST BR de soleus

Pour le groupe BR, nous avons incubé les fibres PRE BR et POST BR de soleus en présence de 0,2 M de GlcNAc libre afin de lever les interactions protéine-protéine mettant en jeu le motif O-GlcNAc. Puis, nous avons établi des relations T/pCa en absence ou en présence de cette molécule pour analyser les conséquences sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires (figure 62). Les fibres sont ensuite lavées dans une solution R pour tester la réversibilité de l'effet démontré.

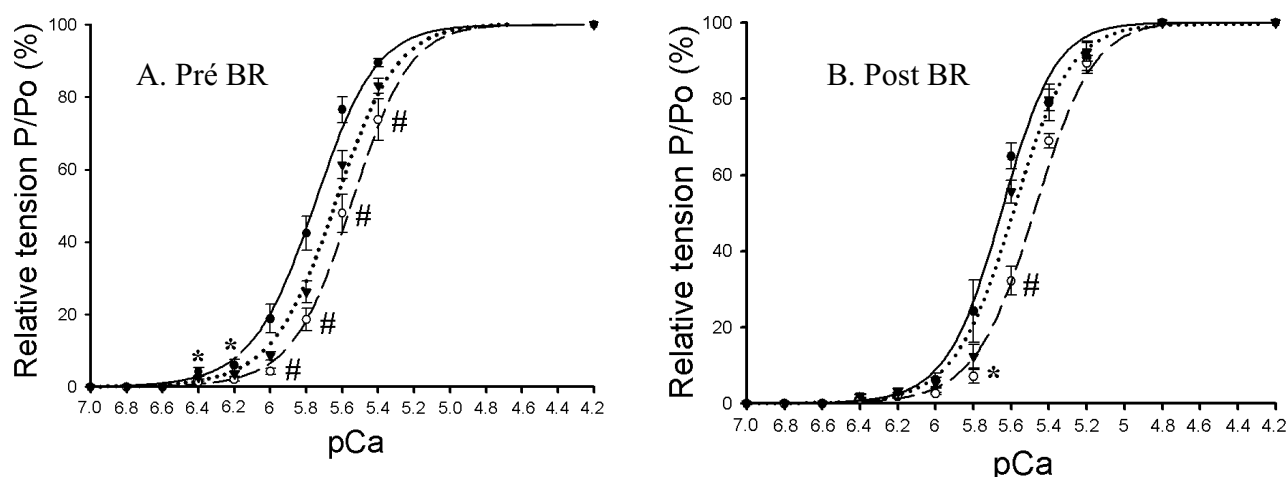


Figure 62 : Effet de 0.2 M de GlcNAc sur les paramètres d'activation calcique des fibres musculaires pelées et isolées de soleus de l'Homme alité pendant deux mois (BR). A, Relation T/pCa de fibres pelées et isolées de **soleus PRE BR** avant (●, courbe continue, n=7), après une incubation dans 0,2 M de GlcNAc (○, courbe discontinue, n=7) et après un lavage dans une solution R (▼, courbe en pointillée, n=7). B, Relation T/pCa de fibres pelées et isolées de **soleus POST BR** avant (●, courbe continue, n=5), après une incubation dans 0,2 M de GlcNAc (○, courbe discontinue, n=5) et après un lavage dans une solution R (▼, courbe en pointillée, n=5). Les courbes sont lissées selon les paramètres de Hill (n_1 pour $P/Po > 50\%$ et n_2 pour $P/Po < 50\%$).

Tableau XX : Paramètres d'activation calcique de fibres isolées de biopsies PRE BR exposées à 0,2 M de GlcNAc (n=7). #p<0.01 GlcNAc vs Contrôle et lavage vs Contrôle.

	CONTROLE	GlcNAc 0.2 M	LAVAGE
pCa _{thr}	6.73±0.07	6.49±0.05	6.66±0.06
pCa ₅₀	5.75±0.03	5.55±0.04 #	5.63±0.02 #
n ₁	2.60±0.13	2.85±0.26	2.80±0.23
n ₂	2.39±0.22	2.51±0.16	2.27±0.12

Tableau XXI : Paramètres d'activation calcique de fibres isolées de biopsies POST BR exposées à 0,2 M de GlcNAc (n=5). #p<0.01

	CONTROLE	GlcNAc 0.2 M	LAVAGE
pCa _{thr}	6.53±0.11	6.45±0.10	6.50±0.07
pCa ₅₀	5.65±0.03	5.47±0.02 #	5.60±0.01
n ₁	3.23±0.42	3.18±0.46	2.76±0.52
n ₂	2.83±0.45	2.47±0.33	2.86±0.19

Pour les biopsies PRE BR et POST BR du groupe BR, la présence de GlcNAc induit une diminution de la sensibilité et de l'affinité calcique des fibres musculaires. En effet, le seuil calcique et la pCa_{50} diminuent après l'incubation dans 0,2 M de GlcNAc. On retrouve donc ici le même effet de la O-GlcNAc que chez le rat. D'autre part, nos résultats montrent que les variations des pCa_{50} (contrôle vs GlcNAc 0,2 M) sont légèrement plus importantes avant le bed-rest ($\Delta = 0,20$) qu'après ($\Delta = 0,18$). La sensibilité calcique est également plus affectée avant qu'après le bed-rest ($\Delta = 0,24$ avant le bed-rest et $\Delta = 0,08$ après le bed-rest). Ces résultats semblent indiquer qu'il pourrait y avoir moins d'interactions protéiques mettant en jeu le motif O-GlcNAc et donc que la glycosylation serait plus faible après le bed-rest. Cet effet est réversible puisque lorsqu'on élimine la GlcNAc, les fibres retrouvent partiellement leurs paramètres d'activation calcique d'origine. La coopérativité des protéines régulatrices du filament fin d'actine n'est pas modifiée par la présence de GlcNAc.

II – B. Taux global de la O-GlcNAc

Les niveaux de glycosylation ont récemment été décrits pour être affectés dans les muscles atrophés chez le rat (Cieniewski et coll., 2006). Nos résultats démontrent que la O-GlcNAc peut moduler les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires humaines comme nous l'avons démontré chez le rat (Hédou et coll., 2007). Nous avons donc mesuré les niveaux globaux de glycosylation après le bed-rest. Ces mesures sont faites pour les groupes BR et BR+EXO sur le VL (4 sujets par groupe). Ce muscle a été choisi du fait de la disponibilité du matériel biologique.

Les variations de glycosylation sont exprimées en % de variation par rapport au taux initial (figure 63).

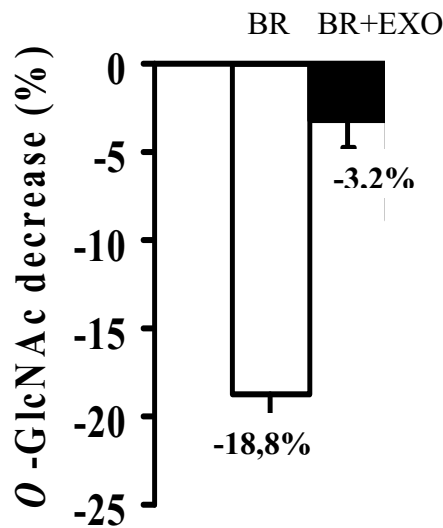


Figure 63 : Variations du taux global de la O-GlcNAc par rapport aux biopsies PRE dans le VL après le bed-rest. $n=4$ pour chaque groupe.

* Différence statistique entre le groupe BR et le groupe BR+EXO ($p<0,05$).

Pour le groupe BR, la glycosylation des échantillons POST est diminuée de 18,8 % comparée aux biopsies PRE. La glycosylation est inchangée dans le groupe BR+EXO. Nos résultats semblent donc indiquer que l'atrophie du muscle après bed-rest est accompagnée d'une diminution du taux de O-GlcNAc comme observé chez le soleus de rat après HH. L'exercice qui prévient de l'atrophie musculaire, semble également prévenir cette diminution de glycosylation.

II – C. Une balance O-GlcNAc/phosphorylation pourrait réguler l'activité de la MLC₂

La O-GlcNAc peut être en interaction voir moduler la phosphorylation des protéines. Cette « balance » entre les deux modifications post-traductionnelles aboutit à ce que des protéines peuvent exister sous de multiples isoformes fonctionnellement distinctes, selon la modification de leur état, à un stade post-traductionnelle (Comer et Hart, 1999). La présence, à la fois, de O-GlcNAc et de phosphate sur une même protéine (sur des sites distincts ou sur le même site) augmenterait fortement le niveau de contrôle que les modifications post-traductionnelle peuvent exercer sur une protéine (Comer et coll., 2000). De tels mécanismes de « balance » entre l'état de phosphorylation et de glycosylation pourraient être à la base de la modulation de l'activité de certaines protéines contractiles dont on sait le rôle crucial de

leur état de phosphorylation dans l'activité contractile. L'analyse des états de phosphorylation et de glycosylation des protéines contractiles est donc d'importance pour la compréhension du rôle des modifications post-traductionnelles dans l'activité contractile du muscle. La MLC_2 est, dans le muscle squelettique, la seule chaîne légère de myosine connue pour pouvoir être phosphorylée, de façon réversible par la Myosin Light Chain Kinase ou MLCK, elle-même dépendante d'une protéine activatrice, la calmoduline. La MLC_2 n'est pas impliquée dans le déclenchement de la contraction, mais a un rôle très important pour sa régulation. Il est connu que la phosphorylation de la MLC_2 augmente la sensibilité au calcium du myofilament pelé (Persechini et coll., 1985). Nous avons d'autre part montré au laboratoire un polymorphisme de la MLC_2 dû à de nombreux états de phosphorylation de cette protéine qui était impliqué dans les changements phénotypiques observés au cours de l'atrophie musculaire (Bozzo et coll., 2003).

Dans le cadre de l'expérience bed-rest chez la femme, nous avons voulu répondre à plusieurs questions : i) *les états de phosphorylation de la MLC_2 dans le muscle humain normal sont-ils identiques à ceux du muscle de rat ?* Autrement dit, les isoformes de MLC_{2s} et de MLC_{2f} du soleus humain présentent-elles les mêmes états non phosphorylés (s et f) et phosphorylés (s1, s2 et f1) que le soleus de rat ?

De plus, les isoformes de la MLC_2 phosphorylées augmentées (MLC_2 S1 et S2) et/ou apparaissant (f1) lors de la transition phénotypique due au bed-rest sont-elle identiques à celles trouvées après HH ? Cette étude est réalisée sur des biopsies de soleus PRE et POST bed-rest par électrophorèse bidimensionnelle de la MLC_2 .

ii) *Existe-t-il des variations opposées de l'état de glycosylation et de phosphorylation de la MLC_2 au cours de l'atrophie et donc un mécanisme de balance Phosphorylation/Glycosylation qui pourrait jouer un rôle dans les changements phénotypiques des chaînes régulatrices de la myosine au cours d'une atrophie fonctionnelle.*

Ces travaux qui ont fait l'objet de communications orales, font l'objet d'un manuscrit en cours de préparation. MLC_2 expression and post-translational modifications in human soleus muscle (Stevens L, Hédou J, Montel V, Tiffreau V, Cochon L, Mounier Y and Bastide B).

1) Les changements phénotypiques de la MLC₂ au cours du bed-rest

La figure 64 représente les variations de l'expression des isoformes de la MLC₂ avant et après le bed-rest pour les groupes BR et BR+EXO.

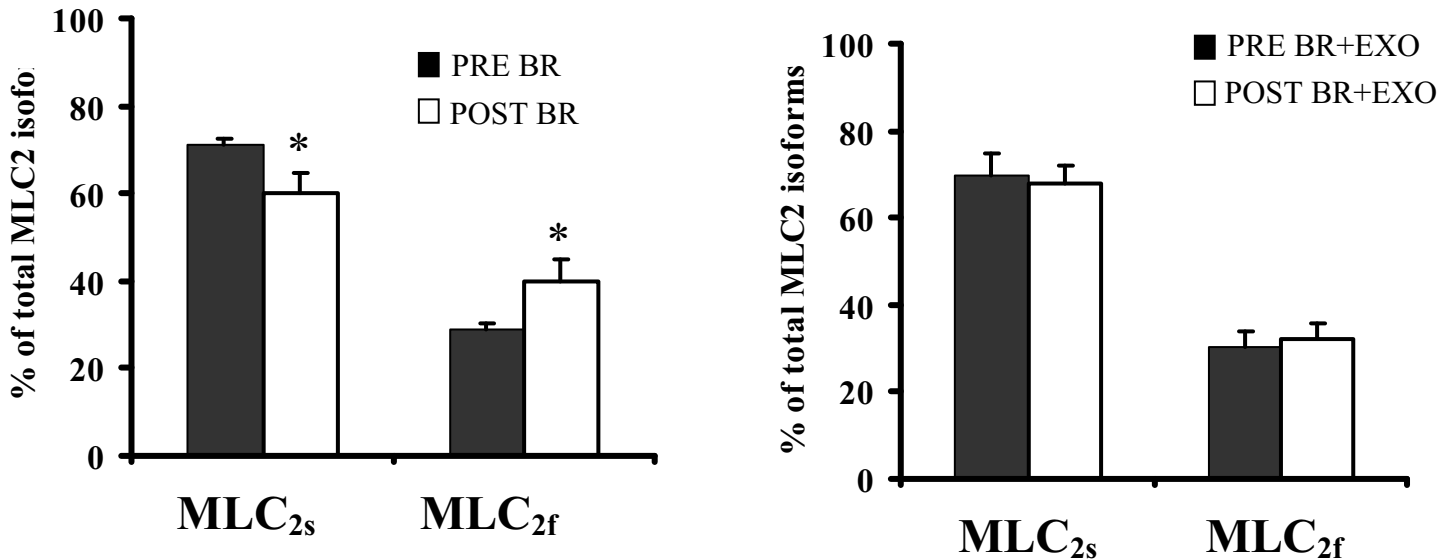


Figure 64: Variations de l'expression des isoformes de la MLC₂ avant et après le bed-rest sur des biopsies de soleus de sujets des groupes BR (à gauche) et BR+EXO (à droite). * $p < 0,05$.

En condition BR, on observe une transition phénotypique lent vers rapide pour la MLC₂ : ainsi la MLC_{2s} diminue de **15,5 %** par rapport à son taux initial alors que la MLC_{2f} augmente de **38 %**. La MLC₂ est donc soumise à une transition lent vers rapide comme cela a été démontré pour les MHC et les MLC chez le rat au cours de l'atrophie fonctionnelle.

Aucune transition d'expression n'est observée pour le groupe BR+EXO.

2) Variations de la phosphorylation de la MLC₂

Dans un premier temps, nous avons voulu voir si les isoformes de MLC_{2s} et de MLC_{2f} du soleus humain présentaient les mêmes états non phosphorylés (s et f) et phosphorylés (s1, s2 et f1) que le soleus de rat. Cette étude est réalisée sur des échantillons de soleus contrôle PRE BR par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle (figure 65).

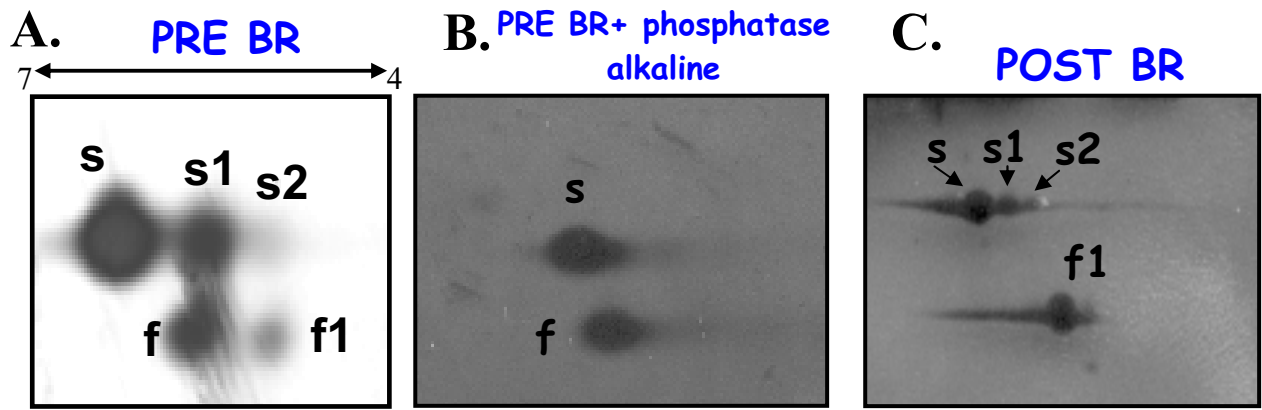


Figure 65 : Séparation par électrophorèse bidimensionnelle et révélation par western blot des variants des isoformes de la MLC_2 (lente « s » et rapide « f »), sur des biopsies de soleus de sujets du groupe BR. A. Séparation avant le bed-rest. B. Séparation après une incubation dans la phosphatase alcaline. . C. Séparation après le bed-rest. Les variants de la MLC_{2s} sont notés s1 et s2 et les variants de la MLC_{2f} sont notés f et f1

Chez l'humain, dans le soleus, la MLC_{2s} présente trois variants: s, s1 et s2 et la MLC_{2f} deux : f et f1 (figure 65A). Chez le rat, on retrouve tous ces variants sauf s2 qui est absent du soleus en condition contrôle (Bozzo et coll., 2003). Après un traitement à la phosphatase (figure 65B), les électrophorèses 2D révèlent que la proportion de s1 est réduite et que les deux spots les plus acides (s2 et f1) disparaissent entièrement. Comme chez le rat, les trois variants s1, s2 et f1 sont donc des formes phosphorylées de la MLC_2 . Les isoformes de MLC_{2s} et de MLC_{2f} du soleus humain présentent donc les mêmes états non phosphorylés (s et f) et phosphorylés (s1, s2 et f1) que le soleus de rat.

Nous avons cherché à définir si les transitions d'expression de la MLC_2 observées après le bed-rest étaient associées à des variations de l'état de phosphorylation de cette protéine. L'étude est réalisée pour les groupes BR et BR+EXO sur des soleus PRE et POST BR par électrophorèse bidimensionnelle de la MLC_2 (figures 65 et 66 et tableau XXII). Le groupe BR+EXO nous permet de tester l'effet exercice sur le maintien des états de phosphorylation de la MLC_2 .

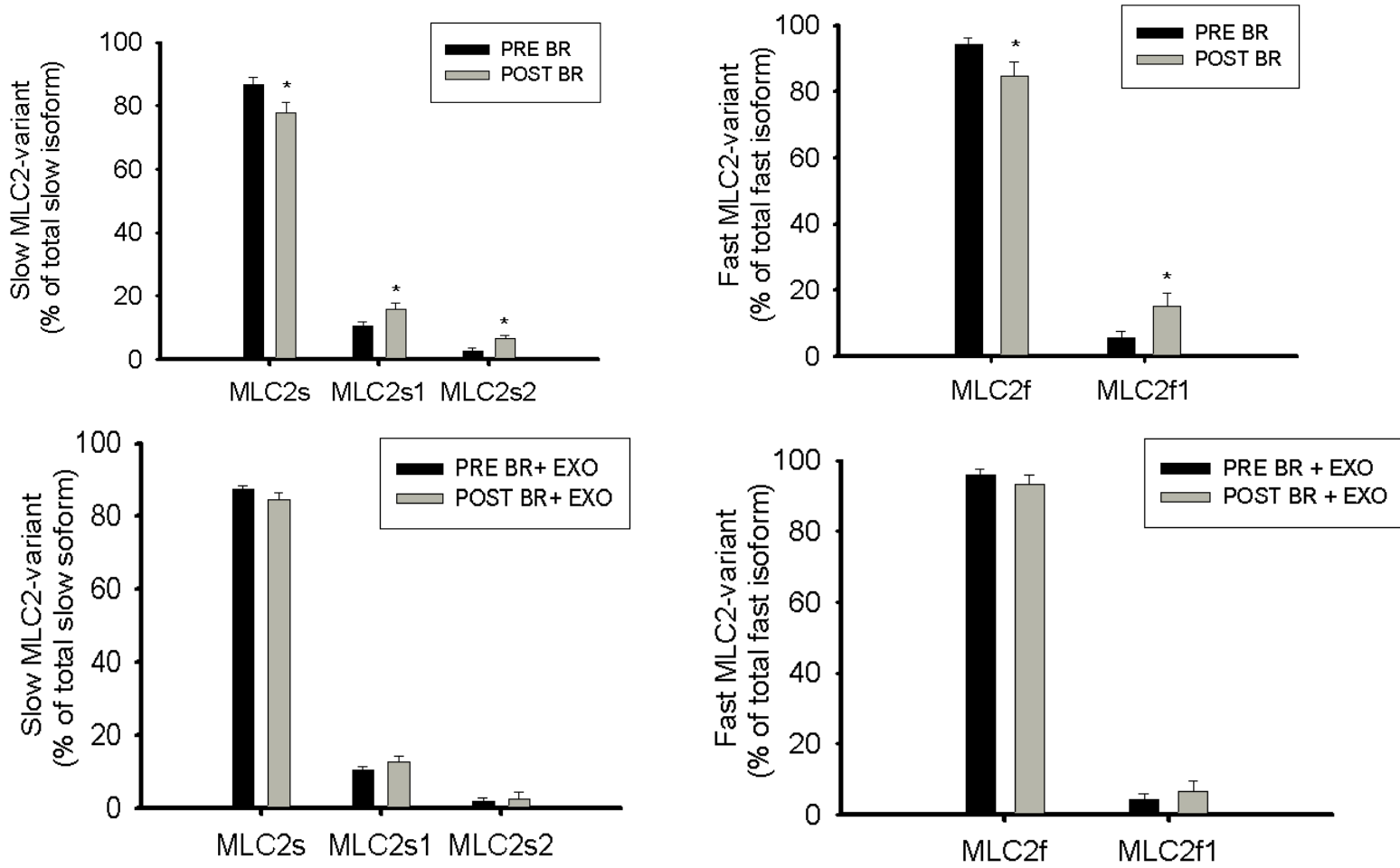


Figure 66 : Représentation graphique des changements de la proportion des variants de la MLC_{2s} et de la MLC_{2f} dans le soleus en conditions BR et BR+EXO. Les données, obtenues par analyse densitométrique des gels électrophorétiques 2D, représentent le pourcentage de la distribution des variants de la MLC_2 par rapport au total en MLC_{2s} ou en MLC_{2f} .

Tableau XXII: Proportion relative de chaque variant des isoformes de la MLC_2 dans le soleus en conditions BR et BR+EXO. Les données, obtenues par densitométrie des westerns blot anti MLC_2 des gels électrophorétiques 2D, représentent le pourcentage de la distribution des variants de la MLC_2 par rapport au total en MLC_{2s} ou en MLC_{2f} . * $p < 0,05$.

		PRE	POST	POST/PRE (%)
BR	MLC_{2s}	86.75±2.29	77.75±3.3	-10.37*
	MLC_{2s1}	10.5±1.55	15.75±2.06	+50*
	MLC_{2s2}	2.75±1.03	6.5±1.26	+136.36*
	MLC_{2f}	94.25±2.02	84.75±4.09	-10.08*
	MLC_{2f1}	5.75±2.02	15.25±4.09	+165.22*
BR+EXO	MLC_{2s}	87.50±1.04	84.5±2.1	NS
	MLC_{2s1}	10.5±0.87	12.75±1.7	NS
	MLC_{2s2}	2±0.82	2.75±1.6	NS
	MLC_{2f}	95.75±1.65	93.25±2.78	NS
	MLC_{2f1}	4.25±1.65	6.75±2.78	NS

Avant le bed-rest, la MLC_{2s} montre la distribution suivante ; s représente 86,75 % du total en MLC_{2s} , s1, 10,5 % et s2, 2,75 % (tableau XXII). La MLC_{2f} présente quant à elle cette distribution : f représente 94,25 % et f1 représente 5,75 % du total en MLC_{2f} (tableau XXII).

Après le bed-rest, la proportion relative de s diminue de 10,37 %, celles de s1 et s2 augmentent de respectivement 50 % et 136,36 % (tableau XXII). De même, la proportion de f diminue de 10,08 % et celle de f1 augmente de 165,22 % (tableau XXII). Après le bed-rest, les formes phosphorylées s1, s2 et f1 sont donc plus fortement exprimées. Le taux de phosphorylation de la MLC_2 augmente donc après le bed-rest. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés au laboratoire chez le rat HH (Bozzo et coll., 2003).

Aucune variation de phosphorylation de la MLC_2 est observée chez les individus BR+EXO. Le protocole d'exercice maintient donc l'état de phosphorylation de la MLC_2 du muscle soleus (tableau XXII).

3) Variations de l'état de glycosylation de la MLC₂ au cours du bed-rest

Pour les groupes BR et BR+EXO, les variations du taux de O-GlcNAc des protéines contractiles du soleus ont été déterminées avant et après bed-rest en réalisant des immunoblots à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre une séquence définie O-GlcNAc (figure 67).

Le signal glycosylé pour chaque isoforme est normalisé en fonction du niveau global de glycosylation de la MLC₂.

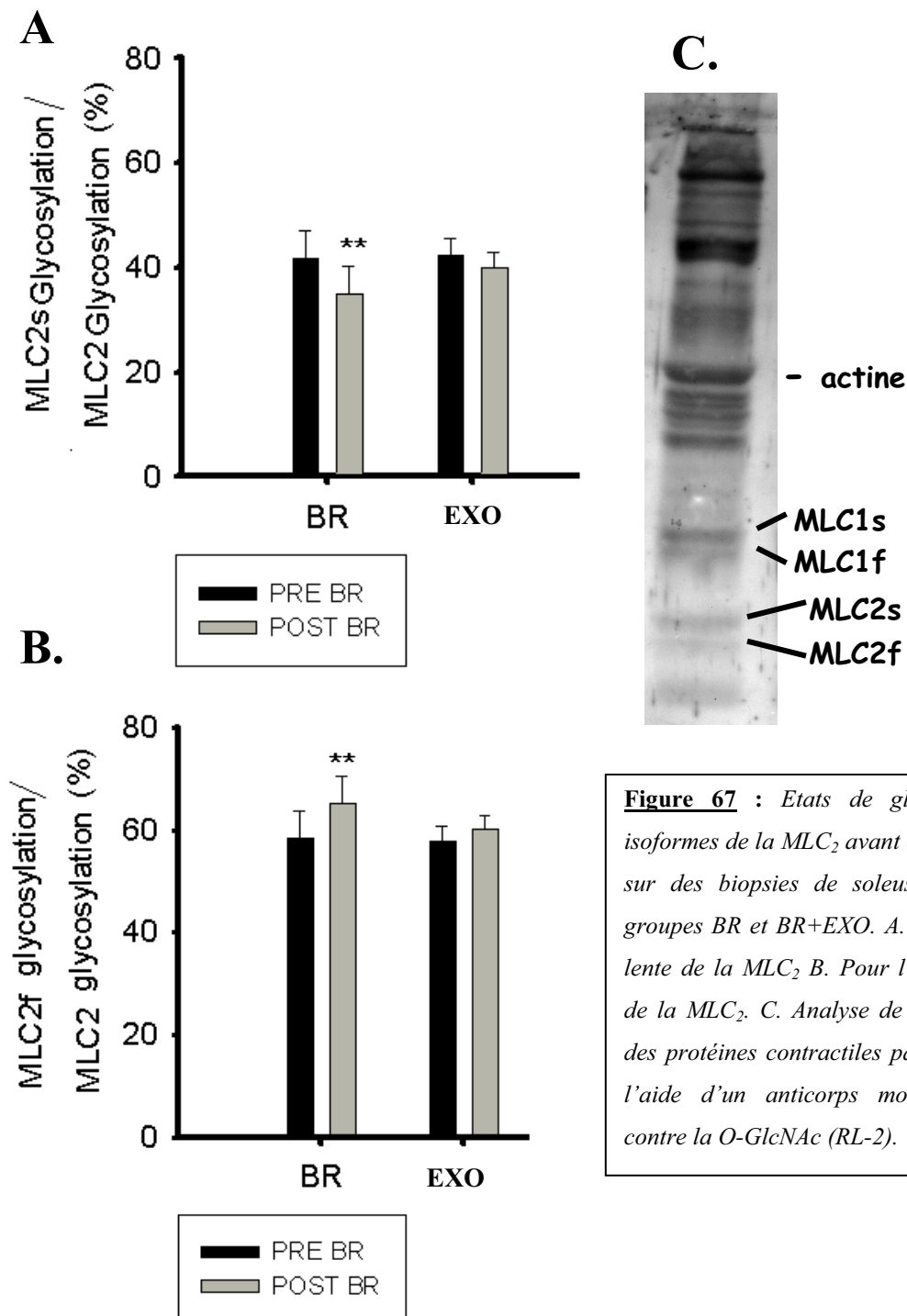


Tableau XXIII: Etats de glycosylation des différents isoformes de la MLC₂ avant et après le bed-rest pour les sujets du groupe BR et BR+EXO. ** $p < 0,02$.

		PRE	POST	POST/PRE (% de variations)
BR	MLC_{2s}	41.71±5.4	34.91±5.34	-16.3 **
	MLC_{2f}	58.27±5.4	65.06±5.34	+11.65 **
BR+EXO	MLC_{2s}	42.32±3.19	39.76±3.19	NS
	MLC_{2f}	57.68±3.19	60.24±2.65	NS

Le taux de glycosylation de chaque isoforme de MLC₂ varie en accord avec les modifications d'expression de chaque isoforme. Pour la MLC_{2s}, on observe une diminution de 16,3 % de glycosylation quand l'expression de la MLC_{2s} diminue de 15,5 %. L'état de glycosylation de la MLC_{2f} augmente de 11,5 % alors que son niveau d'expression augmente de 38 %. Il y a donc une même diminution d'expression et de glycosylation de la MLC_{2s}. Par contre, l'augmentation de l'expression de la MLC_{2f} est plus importante que l'augmentation de son état de glycosylation. Il en résulte donc globalement une diminution du taux de glycosylation de la MLC₂ après BR.

Aucune variation de glycosylation n'est observée pour le groupe BR+EXO, en analogie avec les résultats obtenus pour la variation d'expression des isoformes lentes et rapides de MLC₂ de ce groupe.

Tableau XXIV : Récapitulatif des variations (%) en expression, en glycosylation et en phosphorylation des variants de la MLC₂ en conditions BR et BR+EXO. * $p < 0,05$.

		BR	BR+EXO
Protein expression	MLC _{2s}	-15.5	NS
	MLC _{2f}	+38	NS
Glycosylation	MLC _{2s}	-16.3	NS
	MLC _{2f}	+11.7	NS
Phosphorylation	MLC _{2s}	-10.37	NS
	MLC _{2s1}	+50	NS
	MLC _{2s2}	+136.36*	NS
	MLC _{2f}	-10.08	NS
	MLC _{2f1}	+165.22*	NS

III. Discussion

- *Atrophie et O-GlcNAc*

Ces travaux montrent les effets d'un alitement prolongé de deux mois, le bed-rest qui est un modèle de microgravité simulée chez l'humain (campagne WISE), sur les propriétés du muscle soléaire chez la femme. La spécificité de cette étude est d'évaluer la contribution de nouveaux paramètres (phosphorylation et O-N-Acétylglucosaminylation) sur la perte de force et la perte de masse observées au cours du processus d'atrophie musculaire. De plus, ces expériences ont permis de tester l'efficacité d'une contremesure : un protocole d'exercices comprenant des exercices résistifs et aérobiques.

L'atrophie musculaire consécutive à une période de bed-rest a déjà été décrite. Nos travaux ont permis de confirmer cette atrophie chez des patientes féminines. Le premier point intéressant de cette étude concerne la réponse morphologique adaptative des fibres. Pour le groupe BR, les fibres lentes et rapides sont atrophiées au même degré dans le soleus et le VL

après le bed-rest. Ces résultats ont également été décrits pour cette campagne WISE (Trappe et coll., 2007b). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme (Dudley et coll., 1989 ; Trappe et coll., 2004) et permettent de conclure que les réponses adaptatives des muscles squelettiques au bed-rest chez l'humain ne sont pas fonction du type de fibres. C'est important puisque, durant les vols spatiaux chez l'Homme comme les animaux (rat ou singes) ou durant la microgravité simulée obtenue avec des rats HH, les fibres de type I sont plus sensibles à l'atrophie que les fibres de types II (Edgerton et coll., 1995 ; Fitts et coll., 2000 ; Stevens et coll., 1993).

Pour le groupe BR, les forces maximales absolues P_o , déclinent. Cet effet, observé dans l'ensemble des muscles (soleus et VL), est plus marqué pour les fibres lentes que les fibres rapides et peut-être attribué en partie à l'atrophie des fibres attestée par la diminution du diamètre des fibres. La force spécifique fonction de la surface (P_o/CSA) est diminuée pour les fibres lentes de 26 % et 19 % respectivement dans le soleus et le VL. Ces données sont en accord avec des résultats obtenus après deux mois (Yamashita-Goto et coll., 2001) et trois mois de bed-rest (Trappe et coll., 2004). Cette diminution de la force spécifique ne peut être attribuée à l'atrophie musculaire car dans ce cas, les forces spécifiques seraient égales avant et après le bed-rest comme c'est le cas pour les fibres rapides.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette perte de force dans les fibres lentes. Une première hypothèse serait une diminution du nombre de pont par unité de surface. En effet, la force spécifique dépend du nombre de ponts formés entre les filaments épais de myosine et fins d'actine par unité de surface. Après un bed-rest de 17 jours, Riley et coll., (1998) observent une diminution de la densité des filaments fins mais pas des filaments épais, et attribue à cette augmentation du « filament spacing », la diminution de la force spécifique. Cependant, nos résultats montrent que le niveau d'expression de l'actine n'est pas modifié après le bed-rest dans notre étude (résultats non montrés), ce qui suggère que le rapport entre les filaments fins et épais n'est pas altéré et donc que le nombre de ponts formés n'est pas modifié après bed-rest.

Une autre possibilité pouvant expliquer la perte de force spécifique serait une moins bonne habilité de chaque pont à développer la force. Un autre facteur pouvant affecter sa force est la sensibilité calcique des fibres. Nous démontrons ici que pour le groupe BR, les fibres rapides ne présentent pas de changement de sensibilité calcique (les relations T/pCa PRE et POST BR sont superposées) alors que les fibres lentes présentent une diminution de sensibilité calcique (la relation T/pCa POST BR est shiftée à droite par rapport à la relation

T/pCa PRE BR) ce qui pourrait induire cette perte de force spécifique dans les fibres lentes du soleus et du VL.

Un autre mécanisme susceptible de modifier la production de force pourrait intervenir: il s'agit du niveau de glycosylation des différentes protéines impliquées dans la contraction musculaire (Hédou et coll., 2007). Nous avons démontré une diminution du taux global de O-GlcNAc pour le groupe BR. Cette diminution pourrait altérer la recapture du glucose via l'insuline dans les muscles squelettiques (Stuart et coll., 1988) et participer à la résistance à l'insuline dans lequel la O-GlcNAc est fortement impliquée, observée au cours de l'atrophie musculaire. Cependant, une diminution du taux de O-GlcNAc est également observée chez le rat HH bien qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline ait été décrite dans ce modèle (Langfort et coll., 1997). Nous avons démontré aussi une diminution du niveau de O-GlcNAc dans les soleus atrophiés chez les rats HH (Cieniewski-Bernard et coll., 2006) et le rôle potentiel de la O-GlcNAc dans la régulation de l'affinité calcique (Hédou et coll., 2007). Par conséquent, ce facteur, qui n'a pas encore été étudié jusqu'à présent chez l'humain, pourrait être impliqué dans la régulation de la contraction musculaire et le développement de la force de contraction et donc être impliqué dans les pertes de force observées dans les fibres lentes.

Dans le groupe BR+EXO, toutes les fibres du VL, lentes ou rapides, maintiennent leur diamètre initial. Dans l'ensemble des muscles, les forces maximales et les propriétés d'activation calcique sont préservées ou même augmentées. Cette prévention pourrait mettre en jeu le maintien du phénotype des différentes protéines contractiles (dans les biopsies entières ou les fibres isolées), attesté ici par le profil d'expression des MLC₂ qui n'est pas modifié pour le groupe BR+EXO. Le maintien du niveau de glycosylation (mesuré dans le VL) dans le groupe BR+EXO pourrait également être impliqué. Ainsi, des données récentes ont démontré que la O-GlcNAc pouvait avoir un rôle protecteur contre la dégradation protéasomale et donc dans le développement de l'atrophie (Cieniewski-Bernard et coll., 2004). Un impact bénéfique de l'activité physique sur le syndrome de la résistance à l'insuline dont on sait qu'il est fortement modulé par la O-GlcNAc (Hedman et coll., 2002) a également été décrit, l'exercice étant un stimulateur du transport du glucose (Zierath et coll., 1995).

- *Plasticité des MLC₂ : balance phosphorylation/glycosylation*

Pour les sujets du groupe BR, nos travaux démontrent que l'atrophie fonctionnelle observée chez l'humain s'accompagne d'un changement phénotypique lent vers rapide de la MLC₂. En effet, pour le groupe BR, la MLC_{2s} diminue de 15,5 % et la MLC_{2f} augmente de 38

% après le bed-rest. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues chez le rat HH. Ces changements d'expression associés au rôle modulateur des MLC dans le fonctionnement de la tête S1 des MHC, contribuent sans doute aux adaptations phénotypiques du muscle lors de l'atrophie fonctionnelle. Nous montrons par ailleurs, que ces changements phénotypiques s'accompagnent d'une augmentation de l'expression des formes phosphorylées de la MLC₂ ; s1, s2 et f1 qui augmentent respectivement de 50 %, 136,36 % et 165,22 %, et d'une variation des taux de O-GlcNAc de la MLC₂. Ainsi, la glycosylation de la MLC_{2S} diminue de 16,3 % et celle de la MLC_{2f} augmente de 11,7 %. Ces variations semblent suivre le changement phénotypique de la protéine sauf pour la MLC_{2f} où l'augmentation de la glycosylation est nettement moins importante que l'augmentation de l'expression de la MLC_{2f}. Pour le groupe BR, nous démontrons ainsi que le taux de O-GlcNAc de la MLC₂ diminue alors que parallèlement sa phosphorylation augmente. Pour le groupe BR+EXO, aucune variation de ces modifications post-traductionnelles n'est observée.

Ces résultats suggèrent donc qu'il existe une balance O-GlcNAc/phosphorylation régulant les changements phénotypiques de la MLC₂. Le rôle de la glycosylation de la MLC₂ n'est pas encore connu. La détermination précise du ou des sites pourrait permettre de mieux comprendre son implication, à savoir si le site modifié est identique ou différent du site décrit comme phosphorylé. La phosphorylation de la MLC₂ quant à elle, module l'interaction actomyosine (Perrie et coll., 1973) et augmente la sensibilité des fibres pelées et la force de développement (Persechini et coll., 1985). Si la O-GlcNAc était en interférence avec la phosphorylation, elle pourrait induire une diminution de sensibilité calcique des fibres. Ainsi cette diminution de glycosylation de la MLC₂ ne semble pas pouvoir être impliquée dans la baisse de sensibilité et d'affinité calcique observée dans les modèles d'atrophie fonctionnelle. D'ailleurs, Bozzo et coll., (2003) ont montré que la phosphorylation de la MLC₂ était liée de façon étroite aux changements phénotypiques musculaires, avec une diminution de phosphorylation lors d'une transition rapide vers lent, et une augmentation lors d'une transition lent vers rapide sans être impliquée dans les changements d'affinité calcique. Ainsi, une augmentation de phosphorylation est observée après HH comme après un traitement par un $\beta 2$ agoniste, le clenbutérol chez le rat, bien que dans ce dernier modèle, on observe une augmentation de sensibilité et d'affinité calcique. Même si on ne connaît pas le rôle exact de la O-GlcNAcylation de la MLC₂, on sait que la O-GlcNAc est connue pour agir de manière analogue à la phosphorylation et qu'elle pourrait moduler les états de phosphorylation de la protéine par un phénomène « ying-yang » (Cheng et coll., 2000). Dans le cas de la MLC₂, on peut donc envisager que ces deux modifications post-traductionnelles puissent se réguler

mutuellement pour moduler l'activité et les propriétés des MLC₂ mais plus probablement moduler l'expression des isoformes de cette protéine. Un rôle de cette balance dans l'interaction MLC₂ et MHC pourrait être envisagé tout comme un rôle dans le processus de dégradation des isoformes au cours de la transition phénotypique.

Chapitre V

Conclusion

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La *O*-N-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc, est une glycosylation dynamique cytosolique et nucléaire impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires tels que le transport cellulaire, la dégradation protéique, la régulation de l'expression des protéines... Elle semblerait également jouer un rôle important dans un certain nombre de pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives, le diabète.

Ce travail de thèse a porté sur l'étude de la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique, tissu dans lequel son rôle n'avait été jusqu'ici qu'abordé dans une problématique de résistance à l'insuline et du rôle du muscle dans la régulation du métabolisme du glucose. De récents travaux réalisés au laboratoire ont permis de démontrer que la *O*-GlcNAc pourrait être impliquée dans la physiologie musculaire et l'activité contractile.

Ainsi par une approche protéomique, de nombreuses protéines clés impliquées dans le métabolisme et la contraction musculaire comme la MHC (Myosin Heavy Chain) ont été identifiées comme *O*-GlcNAc (Cieniewski-Bernard et coll., 2004), certaines de ces protéines étant des marqueurs précoces de la plasticité musculaire.

D'autres travaux ont permis de démontrer que la *O*-GlcNAc semblait être impliquée dans le métabolisme des protéines au cours de l'atrophie fonctionnelle induite par le modèle d'hypodynamie-hypokinésie chez le rat, puisque les taux de *O*-GlcNAc sont corrélés au degré d'atrophie du muscle après HH. Cette variation du taux de *O*-GlcNAc, associée à une augmentation de l'expression de la protéine de choc thermique HSP70, lectine de la *O*-GlcNAc, qui peut prévenir les protéines modifiées de la dégradation par le protéasome, pourrait prévenir la dégradation des protéines et donc l'atrophie musculaire induite par HH. Ces différents résultats nous ont amené à définir si la *O*-GlcNAc jouerait un rôle dans la contraction musculaire et régulerait l'activité de certaines protéines notamment au cours de l'atrophie fonctionnelle.

Notre travail s'est articulé autour de trois axes démontrant l'importance exercée par la *O*-GlcNAc dans le muscle squelettique. La première partie de nos recherches a consisté en une identification des protéines *O*-GlcNAc musculaires et à mettre en évidence l'implication de la *O*-GlcNAc dans le processus contractile. La seconde partie de notre travail a eu pour objectif d'identifier les sites *O*-GlcNAc sur les protéines contractiles pour mieux comprendre le rôle de cette glycosylation dans le processus contractile des fibres musculaires et l'existence d'une possible interaction entre la phosphorylation et la glycosylation de ces protéines. Enfin, dans une troisième partie nous avons mis en évidence la possible implication de la *O*-GlcNAc et de la balance glycosylation/phosphorylation dans la régulation de l'atrophie musculaire dans un modèle d'atrophie fonctionnelle chez l'humain. L'ensemble des

résultats obtenus démontre l'importance que cette modification post-traductionnelle peut jouer dans la physiologie musculaire. Le rôle de la *O*-GlcNAc semblerait ainsi tout aussi important que celui de la phosphorylation avec laquelle la *O*-GlcNAc pourrait être en compétition. L'analyse du rôle de la *O*-GlcNAc devra être approfondie dans les années futures. La compréhension du rôle de cette modification dans deux processus aussi important que la contraction et l'atrophie musculaire devrait permettre également d'envisager une implication de cette modification dans certaines pathologies musculaires.

I. Identification des protéines contractiles et rôle de la *O*-GlcNAc dans la contraction musculaire

Nous avons pu démontré par une nouvelle approche protéomique combinant des techniques de purification des protéines contractiles du muscle, de chromatographie d'affinité, de GC-MS que 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) étaient modifiées par la *O*-GlcNAc.

Par ailleurs, nos résultats montrent clairement que la *O*-GlcNAc libre ou engagée dans des interactions protéiques, joue un rôle dans l'activité contractile du muscle squelettique en modulant les propriétés d'activité calcique des fibres musculaires. Ces travaux montrent donc pour la première fois, un rôle potentiel de la *O*-GlcNAc dans la régulation de l'activité contractile et un rôle potentiel dans la régulation de la force de contraction.

Nos travaux ont juste porté sur le rôle des motifs *O*-GlcNAc impliqués ou non dans des interactions protéine-protéine. Par conséquent nous ne connaissons pas les effets d'une diminution ou d'une augmentation des niveaux de glycosylation des protéines contractiles. Nos travaux seront donc poursuivis suivant plusieurs stratégies.

- *La première approche* consistera à analyser l'effet d'une hyperglycosylation sur les propriétés d'activation calcique des fibres musculaires. Pour cette étude, nous réaliserons une organo-culture de muscle soleus et d'epithroclearis (un muscle rapide choisi car très peu épais et facile à cultiver) en présence ou absence d'un inhibiteur spécifique de la *O*-GlcNAcase (le PUGNAc), l'enzyme qui dégrade les motifs *O*-GlcNAc, afin d'augmenter sélectivement le taux de *O*-GlcNAc dans les fibres musculaires. L'état de glycosylation de la biopsie sera analysé après traitement par immunoblot à l'aide d'un anticorps spécifique de la *O*-GlcNAc. L'analyse fonctionnelle des fibres musculaires sera réalisée par une étude des propriétés d'activation calcique et l'analyse des vitesses de raccourcissement des fibres selon la technique de slack

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

test. Des études préliminaires ont permis de déterminer la faisabilité de la conservation des bandelettes de muscle dans un bon état physiologique après 12 heures d'incubation, les propriétés contractiles et d'activation calcique étant similaires à celles d'une biopsie classique.

- *La deuxième approche* consistera à diminuer le taux de *O*-GlcNAc de la biopsie en l'incubant en présence d'alloxan, un inhibiteur de la *O*-GlcNAc transférase. Les mêmes approches fonctionnelles que précédemment seront envisagées pour analyser les conséquences fonctionnelles de cette diminution de glycosylation.

- *La troisième approche correspondra à l'utilisation de culture de myotubes* : Cette analyse sera réalisée à partir de cultures primaires de myotubes. Cette stratégie permettra à la fois de modifier et de faire varier l'état de glycosylation et de phosphorylation des protéines étudiées, tout en permettant d'analyser à la fois les propriétés contractiles, les flux calciques au sein de la cellule. Une analyse structurale sera également effectuée pour déterminer l'intégrité de la structure des fibres musculaires.

L'augmentation ou la diminution du taux de *O*-GlcNAc sur cultures primaires de myotubes nous permettra également de comprendre le rôle de cette modification post-traductionnelle dans la physiologie contractile. Le taux de *O*-GlcNAc sera augmenté par culture des myotubes en présence de glucosamine, intervenant dans la voie de biosynthèse des hexosamines, et/ou en présence de PUGNAc, un inhibiteur spécifique de la *O*-GlcNAcase ; inversement, le taux de *O*-GlcNAc sera diminué par ajout dans le milieu de culture d'azasérine, inhibiteur de la glutamine-fructose-6-P-amidotransférase (GFAT), enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines, ou en présence d'alloxan, inhibiteur de la *O*-GlcNAc transférase.

Différents types d'analyse seront envisagés sur les cultures primaires de myotubes lors de l'application des protocoles permettant de modifier le degré de glycosylation des protéines, en particulier :

- une analyse de l'intégrité sarcomérique par des techniques d'immunohistochimie. Il sera également nécessaire de déterminer si les protéines structurales du sarcomère, telles que l'actinine, la titine, etc..., sont modifiées par la *O*-GlcNAc. L'identification de ces protéines de structure se fera par spectrométrie de masse ;
- une analyse fonctionnelle, notamment la mesure de l'activité contractile par mesure des variations des flux calciques intracellulaires. La variation de calcium intracellulaire lors de stimulations électriques sera réalisée à l'aide de l'indo1. Les mesures de calcium seront effectuées dans le cadre de la plate forme d'imagerie calcique du centre commun d'imagerie cellulaire (CCMIC) de l'IFR 147.

- une analyse du métabolisme énergétique du muscle grâce à des techniques classiques de biochimie par mesure de certains produits des voies métaboliques pour lesquelles des enzymes clé ont été décrites comme modifiées par la *O*-GlcNAc. Il s'agira en particulier du dosage de la créatine phosphate (pour la voie de régénération rapide de l'ATP), du pyruvate et du lactate (pour les voies glycolytiques aérobie et anaérobie), ainsi que du glucose-1-phosphate et du glucose-6-phosphate (pour le métabolisme du glycogène). Ces différents métabolites seront mesurés par des techniques enzymatiques et colorimétriques, ou par l'utilisation de l'HPLC ou de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

II. Identification des sites *O*-GlcNAc par la BEMAD

La deuxième partie de notre travail a consisté à identifier précisément les sites *O*-GlcNAc des protéines contractiles par une approche protéomique : la BEMAD. Grâce à cette technique, nous avons identifié plusieurs sites *O*-GlcNAc sur deux protéines clés de la machinerie contractile du muscle squelettique, l'actine et la myosine. Un site a été localisé sur la séquence 198-207 de l'actine et quatre autres ont été identifiés dans la partie hélicoïdale de la région carboxy-terminale de la myosine et correspondent aux séquences 1094-1106 ; 1295-1303 ; 1701-1712 ; 1913-1922. Ces sites pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine (par exemple entre l'actine et la tropomyosine, ou la myosine et des protéines) et également jouer un rôle dans la modulation des propriétés contractiles du muscle squelettique. Un second rôle dans la polymérisation des protéines est aussi suspecté.

La TnC est une protéine du complexe des troponines qui joue un rôle fondamental dans la régulation calcique de la contraction. Les modulations des propriétés d'activation calcique par la *O*-GlcNAc pourrait impliquer cette protéine soit en modulant son interaction vis-à-vis des autres protéines du filament fin, soit en modifiant les propriétés même de cette protéine. Il sera donc nécessaire de déterminer si les troponines sont modifiées par le motif *O*-GlcNAc.

Il sera également important d'identifier d'autres sites modifiés par un groupement *O*-GlcNAc et/ou phosphate au niveau des protéines contractiles en particulier pour les MLC. L'acquisition récente d'un spectromètre de masse de type FT-ICR-MS sur le Plateau Commun de Spectrométrie de Masse (USTL) devrait permettre de mener à bien la détermination de la localisation précise du/des site(s) modifiés sur les protéines d'intérêt. Nous envisagerons également de réutiliser la technique BEMAD en affinant certaines étapes

afin d'augmenter la sensibilité de notre protocole. En effet un certain nombre d'autres sites concernant d'autres protéines contractiles ont été détectés lors de nos expériences mais n'ont pas pu être confirmés sans ambiguïté ce qui suggère que l'on doive améliorer la reproductibilité de l'identification.

III. Implication de la *O*-GlcNAc dans la physiologie contractile humaine

Dans cette troisième partie, nous montrons les effets d'un alitement prolongé ou BR de deux mois, un modèle de microgravité simulée chez l'humain (campagne WISE), sur les propriétés du muscle soléaire et du vastus lateralis (VL) chez la femme. Après BR, les fibres musculaires rapides et lentes de soleus comme de VL présentent une atrophie marquée mais également une perte de force. La baisse de la force spécifique (Po/Csa) des fibres lentes met sans doute en jeu la diminution de la sensibilité et de l'affinité calcique des fibres lentes. L'ensemble de ces paramètres reste normal pour le groupe de patientes ayant poursuivi un protocole d'exercice qui s'avère une contre mesure efficace contre le développement de l'atrophie comme des modifications phénotypiques. Nos résultats ont également permis de démontrer que l'on retrouvait une diminution du taux de *O*-GlcNAc dans le muscle VL atrophié comme précédemment décrit chez le rat ce qui suggère que la *O*-GlcNAc puisse être impliquée dans le développement de l'atrophie.

Pour les sujets du groupe BR, nos travaux démontrent que l'atrophie fonctionnelle observée chez l'humain s'accompagne d'un changement phénotypique lent vers rapide de la MLC_2 accompagné d'une augmentation des états de phosphorylation similaires à ceux décrits dans un modèle d'atrophie fonctionnelle chez le rat. Pour le groupe BR, nous démontrons aussi que le taux de *O*-GlcNAc de la MLC_2 diminue alors que parallèlement sa phosphorylation augmente. On peut donc envisager que ces deux modifications post-traductionnelles puissent se réguler mutuellement pour moduler l'activité et les propriétés des isoformes de MLC_2 ou moduler l'expression des isoformes de cette protéine. Il sera donc très intéressant de déterminer le/les site(s) précis modifié(s) par la *O*-GlcNAc afin de mieux comprendre le rôle de cette modification sur les propriétés de la MLC_2 et de déterminer le rôle régulateur de la glycosylation de la MLC_2 par une analyse fonctionnelle en utilisant la technique des fibres pelées après modulation de son état de glycosylation.

Il sera également d'un grand intérêt de déterminer s'il existe une balance phosphorylation/*O*-GlcNAc au niveau des protéines des voies de signalisation cellulaire. Il a

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

été démontré que la voie de signalisation PI3K-Akt est impliquée dans les phénomènes d'hypertrophie et d'atrophie du muscle squelettique, l'activation correspondant à une phosphorylation de PI3K et Akt qui vont phosphoryler et activer mTor. De récents travaux ont démontré que certains facteurs impliqués dans cette voie de signalisation tels que PI3K, Akt, GSK3 β ou FOXO sont modifiés par la *O*-GlcNAc (Zachara and Hart, 2004). Or nos travaux ont montré que la diminution du taux de *O*-GlcNAc était associée au développement de l'atrophie chez le rat comme chez l'humain. Il serait donc intéressant de déterminer s'il existe une modulation de l'état d'activation des voies de signalisation cellulaire et donc une modulation de leur niveau de phosphorylation par une balance *O*-GlcNAc/Phosphorylation. Ces travaux seront poursuivis par l'utilisation de techniques d'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt suivie d'une analyse par immunoblot dans un modèle d'atrophie chez l'animal le rat HH.

Chapitre VI

Références

Références

A

Adams GR, Caiozzo VJ, and Baldwin KM. 2003. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* 95:2185-2201.

Adelstein RS and Klee CB. 1981. Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 256:7501-7509.

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.

Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nagamatsu S, Hirano H, and Kawakami H. 2007. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology* 17:127-140.

Amphlett GW, Vanaman TC, and Perry SV. 1976. Effect of the troponin C-like protein from bovine brain (brain modulator protein) on the Mg²⁺-stimulated ATPase of skeletal muscle actinomyosin. *FEBS Lett* 72:163-168.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K, and Watson, J.D. 1993. *Biologie moléculaire de la cellule. Deuxième édition. Edition Médecine-Science Flammarion*, 1219p.

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.

Arvanitis DL, Arvanitis LD, Panourias IG, Kitsoulis P, and Kanavaros P. 2005. Mitochondria-rich normal, metaplastic, and neoplastic cells show overexpression of the epitope H recognized by the monoclonal antibody H. *Pathol Res Pract* 201:319-324.

Auerbach D, Bantle S, Keller S, Hinderling V, Leu M, Ehler E, and Perriard JC. 1999. Different domains of the M-band protein myomesin are involved in myosin binding and M-band targeting. *Mol Biol Cell* 10:1297-1308.

B

Babu A, Scordilis SP, Sonnenblick EH, and Gulati J. 1987. The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle troponin C. *J Biol Chem* 262:5815-5822.

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.

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

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

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 U S A* 85:2573-2577.

Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K, Selkoe DJ, Saunders AJ, and Tanzi RE. 2000. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290:2302-2303.

Biesiadecki BJ, Chong SM, Nosek TM, and Jin JP. 2007. Troponin T core structure and the regulatory NH2-terminal variable region. *Biochemistry* 46:1368-1379.

Blatch GL and Lassle M. 1999. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932-939.

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.

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.

Booth FW. 1994. Terrestrial applications of bone and muscle research in microgravity. *Adv Space Res* 14:373-376.

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.

Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, Pellegrino MA, Maron BJ, Spirito P, Watkins H, and Reggiani C. 1998. A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ Res* 82:106-115.

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-C583.

Bozzo C, Stevens L, Bouet V, Montel V, Picquet F, Falempin M, Lacour M, and Mounier Y. 2004. Hypergravity from conception to adult stage: effects on contractile properties and skeletal muscle phenotype. *J Exp Biol* 207:2793-2802.

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.

Breitbart RE and Nadal-Ginard B. 1986. Complete nucleotide sequence of the fast skeletal troponin T gene. Alternatively spliced exons exhibit unusual interspecies divergence. *J Mol Biol* 188:313-324.

Brenner B, Yu LC, and Podolsky RJ. 1984. X-ray diffraction evidence for cross-bridge formation in relaxed muscle fibers at various ionic strengths. *Biophys J* 46:299-306.

Bronson DD and Schachat FH. 1982. Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J Biol Chem* 257:3937-3944.

Brzeska H, Lynch TJ, and Korn ED. 1989. The effect of actin and phosphorylation on the tryptic cleavage pattern of Acanthamoeba myosin IA. *J Biol Chem* 264:10243-10250.

Burtnick LD and Kay CM. 1977. The calcium-binding properties of bovine cardiac troponin C. *FEBS Lett* 75:105-110.

Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, and Mueckler MM. 2002. Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E241-E250.

Buse MG. 2006. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E1-E8.

Buss F, Kendrick-Jones J, Lionne C, Knight AE, Cote GP, and Paul LJ. 1998. The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* 143:1535-1545.

C

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, and Baldwin KM. 1996. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81:123-132.

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.

Cammarato A, Craig R, Sparrow JC, and Lehman W. 2005. E93K charge reversal on actin perturbs steric regulation of thin filaments. *J Mol Biol* 347:889-894.

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

Cao P, Kimura S, Macias BR, Ueno T, Watenpaugh DE, and Hargens AR. 2005. Exercise within lower body negative pressure partially counteracts lumbar spine deconditioning associated with 28-day bed rest. *J Appl Physiol* 99:39-44.

Casella JF, Craig SW, Maack DJ, and Brown AE. 1987. Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. *J Cell Biol* 105:371-379.

Cetinbas N, Macauley MS, Stubbs KA, Drapala R, and Vocadlo DJ. 2006. Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human O-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. *Biochemistry* 45:3835-3844.

Chalkley RJ and Burlingame AL. 2001. Identification of GlcNAcylation sites of peptides and alpha-crystallin using Q-TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 12:1106-1113.

Chen D, Juarez S, Hartweck L, Alamillo JM, Simon-Mateo C, Perez JJ, Fernandez-Fernandez MR, Olszewski NE, and Garcia JA. 2005. Identification of secret agent as the

O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *J Virol* 79:9381-9387.

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.

Cheung HC, Wang CK, and Malik NA. 1987. Interactions of troponin subunits: free energy of binary and ternary complexes. *Biochemistry* 26:5904-5907.

Cheung WD and Hart GW. 2008. AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem* 283:13009-13020.

Chong PC and Hodges RS. 1982. Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin subunits. Troponin I-troponin T interactions. *J Biol Chem* 257:11667-11672.

Chou CF, Smith AJ, and Omary MB. 1992. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J Biol Chem* 267:3901-3906.

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.

Cieniewski-Bernard C, Mounier Y, Michalski JC, and Bastide B. 2006. O-GlcNAc level variations are associated with the development of skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* 100:1499-1505.

Cohen PT. 2002. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115:241-256.

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.

Cooksey RC and McClain DA. 2002. Transgenic mice overexpressing the rate-limiting enzyme for hexosamine synthesis in skeletal muscle or adipose tissue exhibit total body insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 967:102-111.

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.

Craig R, Szent-Gyorgyi AG, Beese L, Flicker P, Vibert P, and Cohen C. 1980. Electron microscopy of thin filaments decorated with a Ca^{2+} -regulated myosin. *J Mol Biol* 140:35-55.

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-R316.

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

D

da Silva AC and Reinach FC. 1991. Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 16:53-57.

Damer CK, Partridge J, Pearson WR, and Haystead TA. 1998. Rapid identification of protein phosphatase 1-binding proteins by mixed peptide sequencing and data base searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 273:24396-24405.

Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP, and Bodart JF. 2007. O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282:12527-12536.

Dehennaut V, Hanouille X, Bodart JF, Vilain JP, Michalski JC, Landrieu I, Lippens G, and Lefebvre T. 2008. Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem Biophys Res Commun* 369:539-546.

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.

Dent P, MacDougall LK, MacKintosh C, Campbell DG, and Cohen P. 1992. A myofibrillar protein phosphatase from rabbit skeletal muscle contains the beta isoform of protein phosphatase-1 complexed to a regulatory subunit which greatly enhances the dephosphorylation of myosin. *Eur J Biochem* 210:1037-1044.

Deng, Y., Li, B., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Brandt, R., Gong C. X. 2008. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J.*, 22(1):138-145.

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.

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. 1997. Structural and functional adaptations of skeletal muscle to weightlessness. *Int J Sports Med* 18 Suppl 4:S259-S264.

de Tombe, P. P., Solaro, R. J. 2000. Integration of cardiac myofilament activity and regulation with pathways signaling hypertrophy and failure. *Ann. Biomed. Eng.*, 28:991–1001.

Dhoot GK, Frearson N, and 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.

Digel J, Abugo O, Kobayashi T, Gryczynski Z, Lakowicz JR, and Collins JH. 2001. Calcium- and magnesium-dependent interactions between the C-terminus of troponin I and the N-terminal, regulatory domain of troponin C. *Arch Biochem Biophys* 387:243-249.

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

Donaldson SK and Kerrick WG. 1975. Characterization of the effects of Mg²⁺ on Ca²⁺- and Sr²⁺-activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 66:427-444.

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 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.

Droppert PM. 1993. A review of muscle atrophy in microgravity and during prolonged bed rest. *J Br Interplanet Soc* 46:83-86.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, and Brownlee M. 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12222-12226.

Dudley GA, Gollnick PD, Convertino VA, and Buchanan P. 1989. Changes of muscle function and size with bedrest. *Physiologist* 32:S65-S66.

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.

Duverger E, Roche AC, and Monsigny M. 1996. N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology* 6:381-386.

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, Zhou MY, Ohira Y, Klitgaard H, Jiang B, Bell G, Harris B, Saltin B, Gollnick PD, Roy RR, and . 1995. Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J Appl Physiol* 78:1733-1739.

Edgerton, V. R., Roy, R. R. 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.

Egelman EH. 1985. The structure of F-actin. *J Muscle Res Cell Motil* 6:129-151.

Egleman EH and Orlova A. 1995. Allostery, cooperativity, and different structural states in F-actin. *J Struct Biol* 115:159-162.

F

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

Fattoum ,A. 2001. L'atine cytosquelettique et ses protéines associées. I. Analyse fondamentale. *Médecine/sciences*, 17 :193-197.

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.

Ferguson RE, Sun YB, Mercier P, Brack AS, Sykes BD, Corrie JE, Trentham DR, and Irving M. 2003. In situ orientations of protein domains: troponin C in skeletal muscle fibers. *Mol Cell* 11:865-874.

Ferreira A and Rapoport M. 2002. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci* 59:589-595.

Fink RH, Stephenson DG, and Williams DA. 1986. Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J Physiol* 373:513-525.

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.

Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, and Unsworth BR. 1986. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J Appl Physiol* 60:1946-1953.

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.

Francois JM, Sheng Z, Szczesna D, and Potter JD. 1995. The functional role of the domains of troponin-C investigated with thrombin fragments of troponin-C reconstituted into skinned muscle fibers. *J Biol Chem* 270:19287-19293.

Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, and Ito M. 1998. A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* 49:59-68.

Fujita S, Maeda K, and Maeda Y. 1992. Expression in *Escherichia coli* and a functional study of a beta-troponin T 25 kDa fragment of rabbit skeletal muscle. *J Biochem* 112:306-308.

Fulop N, Zhang Z, Marchase RB, and Chatham JC. 2007. Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2227-H2236.

G

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.

Galinska-Rakoczy A, Engel P, Xu C, Jung H, Craig R, Tobacman LS, and Lehman W. 2008. Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J Mol Biol* 379:929-935.

Gandy JC, Rountree AE, and Bijur GN. 2006. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett* 580:3051-3058.

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.

Gao ZH, Moomaw CR, Hsu J, Slaughter CA, and Stull JT. 1992. Autophosphorylation of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Biochemistry* 31:6126-6133.

Gautel M and Goulding D. 1996. A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett* 385:11-14.

Geeves MA and Halsall DJ. 1987. Two-step ligand binding and cooperativity. A model to describe the cooperative binding of myosin subfragment 1 to regulated actin. *Biophys J* 52:215-220.

Geeves MA, Fedorov R, and Manstein DJ. 2005. Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci* 62:1462-1477.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, and Seidman JG. 1990. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 62:999-1006.

Germinario E, Esposito A, Megighian A, Midrio M, Biral D, Betto R, and Danieli-Betto D. 2002. Early changes of type 2B fibers after denervation of rat EDL skeletal muscle. *J Appl Physiol* 92:2045-2052.

Gill A, Gao N, and Lehrman MA. 2002. Rapid activation of glycogen phosphorylase by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *J Biol Chem* 277:44747-44753.

Godt RE and Nosek TM. 1989. Changes of intracellular milieu with fatigue or hypoxia depress contraction of skinned rabbit skeletal and cardiac muscle. *J Physiol* 412:155-180.

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.

Gomes, A.V., Potter, J.D., Szczesna-Cordary, D. 2002. The role of Troponins In Muscle Contraction. *IUBMB Life*, 54:323-333.

Gonzalez B, Negredo P, Hernando R, and Manso R. 2002. Protein variants of skeletal muscle regulatory myosin light chain isoforms: prevalence in mammals, generation and transitions during muscle remodelling. *Pflugers Arch* 443:377-386.

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

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.

Grange RW and Houston ME. 1991. Simultaneous potentiation and fatigue in quadriceps after a 60-second maximal voluntary isometric contraction. *J Appl Physiol* 70:726-731.

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. 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.

Greaser ML, Moss RL, and Reiser PJ. 1988. Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J Physiol* 406:85-98.

Greis KD, Hayes BK, Comer FI, Kirk M, Barnes S, Lowary TL, and Hart GW. 1996. Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycopeptides by beta-elimination and tandem electrospray mass spectrometry. *Anal Biochem* 234:38-49.

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.

Grove BK, Cerny L, Perriard JC, and Eppenberger HM. 1985. Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J Cell Biol* 101:1413-1421.

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.

Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC, and Lefebvre T. 2006. Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology* 16:22-28.

Guinez C, Mir AM, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, and Lefebvre T. 2007. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochem Biophys Res Commun* 361:414-420.

Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, and Lefebvre T. 2008. Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J* 22:2901-2911.

Gulati J, Scordilis S, and Babu A. 1988. Effect of troponin C on the cooperativity in Ca²⁺ activation of cardiac muscle. *FEBS Lett* 236:441-444.

Guth L and Samaha FJ. 1969. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 25:138-152.

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.

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.

Han I, Roos MD, and Kudlow JE. 1998. Interaction of the transcription factor Sp1 with the nuclear pore protein p62 requires the C-terminal domain of p62. *J Cell Biochem* 68:50-61.

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. 2001. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J* 15:1865-1876.

Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, and Krause M. 2005. A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11266-11271.

Hart GW, Greis KD, Dong LY, Blomberg MA, Chou TY, Jiang MS, Roquemore EP, Snow DM, Kreppel LK, Cole RN, and . 1995. O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Adv Exp Med Biol* 376:115-123.

Hart GW. 1997. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* 66:315-335.

- 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.
- Haselgrove JC and Huxley HE. 1973. X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle. *J Mol Biol* 77:549-568.
- 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.
- Haynes PA and Aebersold R. 2000. Simultaneous detection and identification of O-GlcNAc-modified glycoproteins using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 72:5402-5410.
- 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.
- Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, and Meese E. 1998. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet* 7:1859-1872.
- Hedman A, Byberg L, Reneland R, and Lithell HO. 2002. Muscle morphology, self-reported physical activity and insulin resistance syndrome. *Acta Physiol Scand* 175:325-332.
- Hédou J, Cieniewski-Bernard C, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y, and Bastide B. 2007. O-linked N-acetylglucosaminylation is involved in the Ca²⁺ activation properties of rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 282:10360-10369.
- 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.
- Herzberg O, Moulton J, and James MN. 1986. A model for the Ca²⁺-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J Biol Chem* 261:2638-2644.
- Herzberg O, Moulton J, and James MN. 1987. Molecular structure of troponin C and its implications for the Ca²⁺ triggering of muscle contraction. *Methods Enzymol* 139:610-632.

- Hightower RC and Meagher RB. 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics* 114:315-332.
- Hill LE, Mehegan JP, Butters CA, and Tobacman LS. 1992. Analysis of troponin-tropomyosin binding to actin. Troponin does not promote interactions between tropomyosin molecules. *J Biol Chem* 267:16106-16113.
- 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.
- Hitchcock-DeGregori SE, Song Y, and Greenfield NJ. 2002. Functions of tropomyosin's periodic repeats. *Biochemistry* 41:15036-15044.
- Hoar PE and Kerrick WG. 1979. Rabbit diaphragm: two types of fibres determined by calcium strontium activation and protein content. *J Physiol* 295:345-352.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, and Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347:44-49.
- 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* 261:8049-8057.
- 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.
- Houmeida A, Holt J, Tskhovrebova L, and Trinick J. 1995. Studies of the interaction between titin and myosin. *J Cell Biol* 131:1471-1481.
- Houston ME, Green HJ, and Stull JT. 1985. Myosin light chain phosphorylation and isometric twitch potentiation in intact human muscle. *Pflugers Arch* 403:348-352.
- Houston ME, Lingley MD, Stuart DS, and Grange RW. 1987. Myosin light chain phosphorylation in intact human muscle. *FEBS Lett* 219:469-471.
- Houston ME and Grange RW. 1990. Myosin phosphorylation, twitch potentiation, and fatigue in human skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 68:908-913.
- Hresko RC, Heimberg H, Chi MM, and Mueckler M. 1998. Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP. *J Biol Chem* 273:20658-20668.
- Huxley AF. 1973. A note suggesting that the cross-bridge attachment during muscle contraction may take place in two stages. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 183:83-86.
- Huxley HE. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356-1365.

Huxley HE. 1975. The structural basis of contraction and regulation in skeletal muscle. *Kaibogaku Zasshi* 50:310-325.

I

Iio T and Kondo H. 1980. Comparison of the kinetic properties of troponin-C and dansylaziridine-labeled troponin-C1. *J Biochem* 88:547-556.

Ikebe M and Hartshorne DJ. 1985. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 260:10027-10031.

Ikebe M and Reardon S. 1990. Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. *Biochemistry* 29:2713-2720.

Ikebe M and Reardon S. 1990. Phosphorylation of smooth myosin light chain kinase by smooth muscle Ca^{2+} /calmodulin-dependent multifunctional protein kinase. *J Biol Chem* 265:8975-8978.

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.

Irving EA and Bamford M. 2002. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:631-647.

Ito M, Feng J, Tsujino S, Inagaki N, Inagaki M, Tanaka J, Ichikawa K, Hartshorne DJ, and Nakano T. 1997. Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry* 36:7607-7614.

Iyer, S. P., Akimoto, Y., Hart, G. W. 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. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc cycling. *Biochemistry* 42:2493-2499.

Iyer SP and Hart GW. 2003b. Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J Biol Chem* 278:24608-24616.

J

Jackson SP and Tjian R. 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55:125-133.

Janmey, P. A., Shah, J. V., Tang, J. X., Stossel, T. P. 2001. Actin filament networks. *Results Probl Cell Differ.* 32: 181-99. Review.

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.

Jiang MS and Hart GW. 1997. A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 272:2421-2428.

Jin, J.P., Huang G. Q.Q., Ogut, O., Chen, A., Wang, J. 2000. Troponin T isoform regulation and structure-function relation-ships. *Basic Appl. Myol.* 10: 17-26.

Jin JP, Chen A, and Huang QQ. 1998. Three alternatively spliced mouse slow skeletal muscle troponin T isoforms: conserved primary structure and regulated expression during postnatal development. *Gene* 214:121-129.

Jockusch H, Reininghaus J, Stuhlfauth I, and Zippel M. 1988. Reduction of myosin-light-chain phosphorylation and of parvalbumin content in myotonic mouse muscle and its reversal by tocainide. *Eur J Biochem* 171:101-105.

Johnson JD, Charlton SC, and Potter JD. 1979. A fluorescence stopped flow analysis of Ca^{2+} exchange with troponin C. *J Biol Chem* 254:3497-3502.

K

Kamm KE and Stull JT. 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:593-620.

Kasai M and Oosawa F. 1968. The exchangeability of actin-bound calcium with various divalent cations. *Biochim Biophys Acta* 154:520-528.

Kearse KP and Hart GW. 1991. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1701-1705.

Kelly WG and Hart GW. 1989. Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell* 57:243-251.

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.

Kentish, J. C., McCloskey, D. T., Layland, J., Palmer, S., Leiden, J. M., Martin, A. F., Solaro, R. J. 2001. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ. Res.*, 88:1059–1065.

Kerrick WG, Malencik DA, Hoar PE, Potter JD, Coby RL, Pocinwong S, and Fischer EH. 1980. Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflugers Arch* 386:207-213.

Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, and Hsieh-Wilson LC. 2004. Exploring the O-GlcNAc proteome: direct identification of O-GlcNAc-modified proteins from the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13132-13137.

Kim EJ, Amorelli B, Abdo M, Thomas CJ, Love DC, Knapp S, and Hanover JA. 2007. Distinctive inhibition of O-GlcNAcase isoforms by an alpha-GlcNAc thiolsulfonate. *J Am Chem Soc* 129:14854-14855.

Kimura C, Maeda K, Maeda Y, and Miki M. 2002. Ca^{2+} - and S1-induced movement of troponin T on reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence energy transfer spectroscopy. *J Biochem* 132:93-102.

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*, 194p.

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.

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.

Kitazawa T. 1976. Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart in comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biochem* 80:1129-1147.

Klug GA, Botterman BR, and Stull JT. 1982. The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 257:4688-4690.

Kneass ZT and Marchase RB. 2004. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. *J Biol Chem* 279:45759-45765.

Korman VL, Hatch V, Dixon KY, Craig R, Lehman W, and Tobacman LS. 2000. An actin subdomain 2 mutation that impairs thin filament regulation by troponin and tropomyosin. *J Biol Chem* 275:22470-22478.

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.

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.

Kretsinger RH. 1980. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev Biochem* 8:119-174.

Ku NO and Omary MB. 1995. Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J Biol Chem* 270:11820-11827.

L

Labeit S and Kolmerer B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270:293-296.

Laing NG. 2007. Congenital myopathies. *Curr Opin Neurol* 20:583-589.

Langfort J, Zernicka E, Mayet-Sornay MH, Dubaniewicz A, and Desplanches D. 1997. Effects of acute and chronic hindlimb suspension on sensitivity and responsiveness to insulin in the rat soleus muscle. *Biochem Cell Biol* 75:41-44.

Larsson L, Li X, Berg HE, and Frontera WR. 1996. Effects of removal of weight-bearing function on contractility and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Pflugers Arch* 432:320-328.

Lazarus BD, Love DC, and Hanover JA. 2006. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology* 16:415-421.

Leavis PC and Kraft EL. 1978. Calcium binding to cardiac troponin C. *Arch Biochem Biophys* 186:411-415.

Lecarpentier, Y. 1998. La myosine, moteur moléculaire musculaire. *Médecine/sciences*, 14 :1077-1082.

Lee VM, Otvos L, Jr., Carden MJ, Hollosi M, Dietzschold B, and Lazzarini RA. 1988. Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1998-2002.

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* 1472:71-81.

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, and 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.

Lehman W, Craig R, and Vibert P. 1994. Ca(2+)-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature* 368:65-67.

Leszyk J, Grabarek Z, Gergely J, and Collins JH. 1990. Characterization of zero-length cross-links between rabbit skeletal muscle troponin C and troponin I: evidence for direct interaction between the inhibitory region of troponin I and the NH2-terminal, regulatory domain of troponin C. *Biochemistry* 29:299-304.

Li HC and Fajer PG. 1998. Structural coupling of troponin C and actomyosin in muscle fibers. *Biochemistry* 37:6628-6635.

Li X, Lu F, Wang JZ, and Gong CX. 2006. Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *Eur J Neurosci* 23:2078-2086.

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 U S A* 99:7378-7383.

Li Z, Gergely J, and Tao T. 2001. Proximity relationships between residue 117 of rabbit skeletal troponin-I and residues in troponin-C and actin. *Biophys J* 81:321-333.

Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, and Gong CX. 2004. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10804-10809.

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 U S A* 97:2820-2825.

Lorenz M, Poole KJ, Popp D, Rosenbaum G, and Holmes KC. 1995. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J Mol Biol* 246:108-119.

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.

Love DC and Hanover JA. 2005. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005:re13.

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.

Lowy J, Popp D, and Stewart AA. 1991. X-ray studies of order-disorder transitions in the myosin heads of skinned rabbit psoas muscles. *Biophys J* 60:812-824.

Luo Y, Leszyk J, Li B, Gergely J, and Tao T. 2000. Proximity relationships between residue 6 of troponin I and residues in troponin C: further evidence for extended conformation of troponin C in the troponin complex. *Biochemistry* 39:15306-15315.

Lymn RW and Taylor EW. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10:4617-4624.

M

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.

Malnic B, Farah CS, and Reinach FC. 1998. Regulatory properties of the NH₂- and COOH-terminal domains of troponin T. ATPase activation and binding to troponin I and troponin C. *J Biol Chem* 273:10594-10601.

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.

Mannherz HG. 1992. Crystallization of actin in complex with actin-binding proteins. *J Biol Chem* 267:11661-11664.

Manning DR and Stull JT. 1979. Myosin light chain phosphorylation and phosphorylase A activity in rat extensor digitorum longus muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 90:164-170.

Manning DR and Stull JT. 1982. Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol* 242:C234-C241.

Marieb, E.N. 1993. *Anatomie et physiologie humaines. Deuxième édition. Edition DeBoeck.* 1114p.

Marsden BJ, Shaw GS, and Sykes BD. 1990. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem Cell Biol* 68:587-601.

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.

Marshall S, Bacote V, and Traxinger RR. 1991. Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem* 266:10155-10161.

Maruyama K, Matsubara S, Natori R, Nonomura Y, and Kimura S. 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function. *J Biochem* 82:317-337.

Matthews, J. A., Belof, J. L., Acevedo-Duncan, M., Potter, R. L. 2007. Glucosamine-induced increase in Akt phosphorylation corresponds to increased endoplasmic reticulum stress in astroglial cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 298:109-123.

Maytum R, Lehrer SS, and Geeves MA. 1999. Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* 38:1102-1110.

Maytum R, Geeves MA, and Lehrer SS. 2002. A modulatory role for the troponin T tail domain in thin filament regulation. *J Biol Chem* 277:29774-29780.

McClain DA. 2002. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications* 16:72-80.

McGough A and Way M. 1995. Molecular model of an actin filament capped by a severing protein. *J Struct Biol* 115:144-150.

Medina L, 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.

Meredith C, Herrmann R, Parry C, Liyanage K, Dye DE, Durling HJ, Duff RM, Beckman K, de Visser M, van der Graaff MM, Hedera P, Fink JK, Petty EM, Lamont P, Fabian V, Bridges L, Voit T, Mastaglia FL, and Laing NG. 2004. Mutations in the slow skeletal muscle fiber myosin heavy chain gene (MYH7) cause laing early-onset distal myopathy (MPD1). *Am J Hum Genet* 75:703-708.

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.

Miller JR, Silver PJ, and Stull JT. 1983. The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 24:235-242.

- 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.
- Miller MW, Caracciolo MR, Berlin WK, and Hanover JA. 1999. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch Biochem Biophys* 367:51-60.
- Milligan RA, Whittaker M, and Safer D. 1990. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* 348:217-221.
- Milligan RA. 1996. Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:21-26.
- 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* 91:423-425.
- Moiescu, D. G., and Thieleczek, R. 1979. Sarcomere length effects on the Sr^{2+} - and Ca^{2+} -activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem. Biophys. Acta.*, 546, 64-76.
- Moore RL and Stull JT. 1984. Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am J Physiol* 247:C462-C471.
- Moore RL, Houston ME, Iwamoto GA, and Stull JT. 1985. Phosphorylation of rabbit skeletal muscle myosin in situ. *J Cell Physiol* 125:301-305.
- Moorhead G, Johnson D, Morrice N, and Cohen P. 1998. The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett* 438:141-144.
- Morano I, Wankerl M, Bohm M, Erdmann E, and Ruegg JC. 1989. Myosin P-light chain isoenzymes in the human heart: evidence for diphosphorylation of the atrial P-LC form. *Basic Res Cardiol* 84:298-305.
- Morano I, Adler K, Agostini B, and Hasselbach W. 1992. Expression of myosin heavy and light chains and phosphorylation of the phosphorylatable myosin light chain in the heart ventricle of the European hamster during hibernation and in summer. *J Muscle Res Cell Motil* 13:64-70.
- Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, and Baylink DJ. 1979. A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist* 22:S23-S24.
- Morgan MJ, Earnshaw JC, and Dhoot GK. 1993. Novel developmentally regulated exon identified in the rat fast skeletal muscle troponin T gene. *J Cell Sci* 106 (Pt 3):903-908.
- Morimoto S and Ohtsuki I. 1988. Effect of substitution of troponin C in cardiac myofibrils with skeletal troponin C or calmodulin on the Ca^{2+} - and Sr^{2+} -sensitive ATPase activity. *J Biochem* 104:149-154.

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.

Moss RL, Lauer MR, Giulian GG, and Greaser ML. 1986. Altered Ca²⁺ dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J Biol Chem* 261:6096-6099.

Mossakowska M, Moraczewska J, Khaitlina S, and Strzelecka-Golaszewska H. 1993. Proteolytic removal of three C-terminal residues of actin alters the monomer-monomer interactions. *Biochem J* 289 (Pt 3):897-902.

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, Deavers DR, Meininger GA, and Davis TP. 1980. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. *J Appl Physiol* 48:479-486.

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, Grupp IL, Grupp G, O'Toole BA, Kier AB, Boivin GP, Neumann J, and Wieczorek DF. 1995. Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart. *J Biol Chem* 270:30593-30603.

Muthuchamy, M., Rethinasamy, P., and Wieczorek, D. F. 1997. Tropomyosin structure and function. New insights. *Trends Cardiovasc. Med.* 7: 124-128.

Myers A, Holmans P, Marshall H, Kwon J, Meyer D, Ramic D, Shears S, Booth J, DeVrieze FW, Crook R, Hamshire M, Abraham R, Tunstall N, Rice F, Carty S, Lillystone S, Kehoe P, Rudrasingham V, Jones L, Lovestone S, Perez-Tur J, Williams J, Owen MJ, Hardy J, and Goate AM. 2000. Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* 290:2304-2305.

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.

Nassar R, Malouf NN, Kelly MB, Oakeley AE, and Anderson PA. 1991. Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ Res* 69:1470-1475.

Ngai SM, Pearlstone JR, Smillie LB, and Hodges RS. 2001. Characterization of the biologically important interaction between troponin C and the N-terminal region of troponin I. *J Cell Biochem* 83:99-110.

Nolte D and Muller U. 2002. Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome* 13:62-64.

Nudel U, Calvo JM, Shani M, and Levy Z. 1984. The nucleotide sequence of a rat myosin light chain 2 gene. *Nucleic Acids Res* 12:7175-7186.

O

O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, and Marth JD. 2004. Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* 24:1680-1690.

Obermann WM, Gautel M, Weber K, and Furst DO. 1997. Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J* 16:211-220.

Obermann WM, van der Ven PF, Steiner F, Weber K, and Furst DO. 1998. Mapping of a myosin-binding domain and a regulatory phosphorylation site in M-protein, a structural protein of the sarcomeric M band. *Mol Biol Cell* 9:829-840.

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.

Ogut O and Jin JP. 1998. Developmentally regulated, alternative RNA splicing-generated pectoral muscle-specific troponin T isoforms and role of the NH2-terminal hypervariable region in the tolerance to acidosis. *J Biol Chem* 273:27858-27866.

Ogut O, Granzier H, and Jin JP. 1999. Acidic and basic troponin T isoforms in mature fast-twitch skeletal muscle and effect on contractility. *Am J Physiol* 276:C1162-C1170.

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.

Oldfors A. 2007. Hereditary myosin myopathies. *Neuromuscul Disord* 17:355-367.

Orentlicher M, Brandt PW, and Reuben JP. 1977. Regulation of tension in skinned muscle fibers: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am J Physiol* 233:C127-C134.

Orlova A and Egelman EH. 1993. A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament. *J Mol Biol* 232:334-341.

P

Pan BS, Gordon AM, and Potter JD. 1991. Deletion of the first 45 NH₂-terminal residues of rabbit skeletal troponin T strengthens binding of troponin to immobilized tropomyosin. *J Biol Chem* 266:12432-12438.

Park J, Kwon H, Kang Y, and Kim Y. 2007. Proteomic analysis of O-GlcNAc modifications derived from streptozotocin and glucosamine induced beta-cell apoptosis. *J Biochem Mol Biol* 40:1058-1068.

Park 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.

Parmacek MS and Leiden JM. 1991. Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation* 84:991-1003.

Parry DA and Squire JM. 1973. Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J Mol Biol* 75:33-55.

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.
- Pearlstone JR and Smillie LB. 1982. Binding of troponin-T fragments to several types of tropomyosin. Sensitivity to Ca^{2+} 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 G, Rizzuto N, Autilio-Gambetti L, and Gambetti P. 1985. Paired helical filaments from Alzheimer disease patients contain cytoskeletal components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3916-3920.
- 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.
- 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* 260:7951-7954.
- Pette D and Staron RS. 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 116:1-76.
- 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.
- Pieples K, Arteaga G, Solaro RJ, Grupp I, Lorenz JN, Boivin GP, Jagatheesan G, Labitzke E, DeTombe PP, Konhilas JP, Irving TC, and Wieczorek DF. 2002. Tropomyosin 3 expression leads to hypercontractility and attenuates myofilament length-dependent Ca^{2+} activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1344-H1353.
- Pires EM and Perry SV. 1977. Purification and properties of myosin light-chain kinase from fast skeletal muscle. *Biochem J* 167:137-146.
- Pol-Rodriguez, M. M., Schwartz, G. A., English, A.W. 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.

Pollard TD and Cooper JA. 1984. Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* 23:6631-6641.

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.

Potter JD, Sheng Z, Pan BS, and Zhao J. 1995. A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *J Biol Chem* 270:2557-2562.

Putkey JA, Sweeney HL, and Campbell ST. 1989. Site-directed mutation of the trigger calcium-binding sites in cardiac troponin C. *J Biol Chem* 264:12370-12378.

Putkey JA, Liu W, and Sweeney HL. 1991. Function of the N-terminal calcium-binding sites in cardiac/slow troponin C assessed in fast skeletal muscle fibers. *J Biol Chem* 266:14881-14884.

R

Rajan S, Ahmed RP, Jagatheesan G, Petrashevskaya N, Boivin GP, Urboniene D, Arteaga GM, Wolska BM, Solaro RJ, Liggett SB, and Wiecek DF. 2007. Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ Res* 101:205-214.

Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, and Holden HM. 1993a. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261:50-58.

Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, and Milligan RA. 1993b. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261:58-65.

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* 449:573-588.

Reuben, J. P., Wood, D. S., Eastwood, A. N. 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, 256-269.

Riley DA, Bain JL, Thompson JL, Fitts RH, Widrick JJ, Trappe SW, Trappe TA, and Costill DL. 1998. Disproportionate loss of thin filaments in human soleus muscle after 17-day bed rest. *Muscle Nerve* 21:1280-1289.

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.

Robertson LA, Moya KL, and Breen KC. 2004. The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 6:489-495.

Robertson SP, Johnson JD, and Potter JD. 1981. The time-course of Ca²⁺ exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca²⁺. *Biophys J* 34:559-569.

Robinson KA, Weinstein ML, Lindenmayer GE, and Buse MG. 1995. Effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes* 44:1438-1446.

Robles-Flores M, Melendez L, Garcia W, Mendoza-Hernandez G, Lam TT, Castaneda-Patlan C, and Gonzalez-Aguilar H. 2008. Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochim Biophys Acta* 1783:695-712.

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.

Roquemore EP, Chevrier MR, Cotter RJ, and Hart GW. 1996. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry* 35:3578-3586.

Ross, M. D., Su, K., Baker, J. R., Kudlow, J. E. 1997. O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol. Cell. Biol.*, 17:6472-6480.

Roush CL, Kennelly PJ, Glaccum MB, Helfman DM, Scott JD, and Krebs EG. 1988. Isolation of the cDNA encoding rat skeletal muscle myosin light chain kinase. Sequence and tissue distribution. *J Biol Chem* 263:10510-10516.

Roy RR, Baldwin KM, and Edgerton VR. 1991. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. *Exerc Sport Sci Rev* 19:269-312.

Ryder JW, Lau KS, Kamm KE, and Stull JT. 2007. Enhanced skeletal muscle contraction with myosin light chain phosphorylation by a calmodulin-sensing kinase. *J Biol Chem* 282:20447-20454.

S

Sabry MA and Dhoot GK. 1991. Identification and pattern of transitions of some developmental and adult isoforms of fast troponin T in some human and rat skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 12:447-454.

Saito K, Yoshida M, and Tanaka H. 1992. Sensitivity of cultured and skinned chick myotube to calcium, strontium, and barium ions examined by recording isometric contractions. *J Cell Physiol* 150:45-51.

Samson F, Mesnard L, Mihovilovic M, Potter TG, Mercadier JJ, Roses AD, and Gilbert JR. 1994. A new human slow skeletal troponin T (TnTs) mRNA isoform derived from alternative splicing of a single gene. *Biochem Biophys Res Commun* 199:841-847.

Satyshur KA, Rao ST, Pyzalska D, Drendel W, Greaser M, and Sundaralingam M. 1988. Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2-A resolution. *J Biol Chem* 263:1628-1647.

Schachat F, Schmidt JM, Maready M, and Briggs MM. 1995. Chicken perinatal troponin Ts are generated by a combination of novel and phylogenetically conserved alternative splicing pathways. *Dev Biol* 171:233-239.

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.

Schiaffino S, Serrano AL, Jerkovic R, Di Lisi R, and Murgia M. 1998. Neural regulation of myosin gene expression in regenerating skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 163:S11-S15.

Schirm M, Kalmokoff M, Aubry A, Thibault P, Sandoz M, and Logan SM. 2004. Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J Bacteriol* 186:6721-6727.

Schultz J and Pils B. 2002. Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Lett* 529:179-182.

Schulze K, Gallagher P, and Trappe S. 2002. Resistance training preserves skeletal muscle function during unloading in humans. *Med Sci Sports Exerc* 34:303-313.

Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, and Marth JD. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5735-5739.

Sheng Z, Strauss WL, Francois JM, and Potter JD. 1990. Evidence that both Ca(2+)-specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J Biol Chem* 265:21554-21560.

Sheng Z, Pan BS, Miller TE, and Potter JD. 1992. Isolation, expression, and mutation of a rabbit skeletal muscle cDNA clone for troponin I. The role of the NH2 terminus of fast skeletal muscle troponin I in its biological activity. *J Biol Chem* 267:25407-25413.

Sheterline P and Sparrow JC. 1994. Actin. *Protein Profile* 1:1-121.

Sia SK, Li MX, Spyrapoulos L, Gagne SM, Liu W, Putkey JA, and Sykes BD. 1997. Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J Biol Chem* 272:18216-18221.

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.

Smillie LB, Golosinska K, and Reinach FC. 1988. Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal muscle troponin T. *J Biol Chem* 263:18816-18820.

Sohn RL, Vikstrom KL, Strauss M, Cohen C, Szent-Gyorgyi AG, and Leinwand LA. 1997. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J Mol Biol* 266:317-330.

Solaro RJ, Lee JA, Kentish JC, and Allen DG. 1988. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res* 63:779-787.

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.

- Stephenson DG and Thieleczek R. 1986. Activation of the contractile apparatus of skinned fibres of frog by the divalent cations barium, cadmium and nickel. *J Physiol* 380:75-92.
- Sternberger NH, Sternberger LA, and Ulrich J. 1985. Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4274-4276.
- 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, Bastide B, Kischel P, Pette D, and Mounier Y. 2002. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1025-C1030.
- Stevens L, Bastide B, Bozzo C, and Mounier Y. 2004. Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch* 448:507-514.
- Stuart CA, Shangraw RE, Prince MJ, Peters EJ, and Wolfe RR. 1988. Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle. *Metabolism* 37:802-806.
- Stull JT, Nunnally MH, Moore RL, and Blumenthal DK. 1985. Myosin light chain kinases and myosin phosphorylation in skeletal muscle. *Adv Enzyme Regul* 23:123-140.
- Suarez MC, Machado CJ, Lima LM, Smillie LB, Pearlstone JR, Silva JL, Sorenson MM, and Foguel D. 2003. Role of hydration in the closed-to-open transition involved in Ca²⁺ binding by troponin C. *Biochemistry* 42:5522-5530.
- Sumegi M, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradszky KF, and Udvardy A. 2003. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1284-1289.
- Sweeney HL and Stull JT. 1986. Phosphorylation of myosin in permeabilized mammalian cardiac and skeletal muscle cells. *Am J Physiol* 250:C657-C660.
- Sweeney HL, Brito RM, Rosevear PR, and Putkey JA. 1990a. The low-affinity Ca²⁺(+)-binding sites in cardiac/slow skeletal muscle troponin C perform distinct functions: site I alone cannot trigger contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9538-9542.
- Sweeney HL and Stull JT. 1990b. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:414-418.
- 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.

Syka JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, and Hunt DF. 2004. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9528-9533.

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, and Potter JD. 1996a. The regulatory light chains of myosin modulate cross-bridge cycling in skeletal muscle. *J Biol Chem* 271:5246-5250.

Szczesna D, Guzman G, Miller T, Zhao J, Farokhi K, Ellemberger H, and Potter JD. 1996b. The role of the four Ca²⁺ binding sites of troponin C in the regulation of skeletal muscle contraction. *J Biol Chem* 271:8381-8386.

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. 2003. Regulatory light chains of striated muscle myosin. Structure, function and malfunction. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 3:187-197.

Szilagyi L, Balint M, Sreter FA, and Gergely J. 1979. Photoaffinity labelling with an ATP analog of the N-terminal peptide of myosin. *Biochem Biophys Res Commun* 87:936-945.

T

Takagi A, Yonemoto K, and Sugita H. 1978. Single-skinned human muscle fibers: activation by calcium and strontium. *Neurology* 28:497-499.

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.

Takman R, Jiang H, Schaefer E, Levine RA, and Lazarovici P. 2004. Nerve growth factor pretreatment attenuates oxygen and glucose deprivation-induced c-Jun amino-terminal kinase 1 and stress-activated kinases p38alpha and p38beta activation and confers neuroprotection in the pheochromocytoma PC12 Model. *J Mol Neurosci* 22:237-250.

- Talbot JA and Hodges RS. 1981. Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. Relationship of amino acid sequence to biological activity. *J Biol Chem* 256:2798-2802.
- 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.
- Tanokura M and Ohtsuki I. 1982. Location of troponin I-binding on troponin T sequence. *FEBS Lett* 145:147-149.
- Tao T, Gong BJ, and Leavis PC. 1990. Calcium-induced movement of troponin-I relative to actin in skeletal muscle thin filaments. *Science* 247:1339-1341.
- 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.
- Terry M, Walker DD, and Ferrari MB. 2006. Protein phosphatase activity is necessary for myofibrillogenesis. *Cell Biochem Biophys* 45:265-278.
- Tesch PA, Thorsson A, and Colliander EB. 1990. Effects of eccentric and concentric resistance training on skeletal muscle substrates, enzyme activities and capillary supply. *Acta Physiol Scand* 140:575-580.
- 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.
- Thomason DB and Booth FW. 1990. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 68:1-12.
- Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, and Kudlow JE. 2004. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem* 279:53665-53673.
- Torres CR and Hart GW. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259:3308-3317.
- 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.
- Trappe S, Trappe T, Gallagher P, Harber M, Alkner B, and Tesch P. 2004. Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol* 557:501-513.

Trappe S, Creer A, Slivka D, Minchev K, and Trappe T. 2007a. Single muscle fiber function with concurrent exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest in women. *J Appl Physiol* 103:1242-1250.

Trappe TA, Burd NA, Louis ES, Lee GA, and Trappe SW. 2007b. Influence of concurrent exercise or nutrition countermeasures on thigh and calf muscle size and function during 60 days of bed rest in women. *Acta Physiol (Oxf)* 191:147-159.

Trappe S, Creer A, Minchev K, Slivka D, Louis E, Luden N, and Trappe T. 2008. Human soleus single muscle fiber function with exercise or nutrition countermeasures during 60 days of bed rest. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R939-R947.

Tripet B, Van Eyk JE, and Hodges RS. 1997. Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca²⁺-dependent regulation of muscle contraction. *J Mol Biol* 271:728-750.

Tubman LA, Rassier DE, and MacIntosh BR. 1996. Absence of myosin light chain phosphorylation and twitch potentiation in atrophied skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 74:723-728.

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 U S A* 93:4459-4464.

V

van Eerd JP and Takahashi K. 1975. The amino acid sequence of bovine cardiac troponin-C. Comparison with rabbit skeletal troponin-C. *Biochem Biophys Res Commun* 64:122-127.

Vandenboom R, Grange RW, and Houston ME. 1993. Threshold for force potentiation associated with skeletal myosin phosphorylation. *Am J Physiol* 265:C1456-C1462.

Verbert, A., Montreuil, J., Bouquelet, S., Cacan, R., Debray, H., Fournet, B., Michalski, J.C., Spik, G., Strecker, G. 1995. *Methods on Glycoconjugates- A laboratory manual*, Ed Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Vibert P, Craig R, and Lehman W. 1997. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J Mol Biol* 266:8-14.

Virkamaki A, Daniels MC, Hamalainen S, Utriainen T, McClain D, and Yki-Jarvinen H. 1997. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance in multiple insulin sensitive tissues. *Endocrinology* 138:2501-2507.

Virkamaki A and Yki-Jarvinen H. 1999. Allosteric regulation of glycogen synthase and hexokinase by glucosamine-6-phosphate during glucosamine-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. *Diabetes* 48:1101-1107.

Vosseller K, Wells L, Lane MD, and Hart GW. 2002. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5313-5318.

W

Walsh MP, Vallet B, Autric F, and Demaille JG. 1979. Purification and characterization of bovine cardiac calmodulin-dependent myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 254:12136-12144.

Wang CK and Cheung HC. 1985. Energetics of the binding of calcium and troponin I to troponin C from rabbit skeletal muscle. *Biophys J* 48:727-739.

Wang J and Jin JP. 1997. Primary structure and developmental acidic to basic transition of 13 alternatively spliced mouse fast skeletal muscle troponin T isoforms. *Gene* 193:105-114.

Wang J and Jin JP. 1998. Conformational modulation of troponin T by configuration of the NH2-terminal variable region and functional effects. *Biochemistry* 37:14519-14528.

Wang J, Tung YC, Wang Y, Li XT, Iqbal K, and Grundke-Iqbal I. 2001. Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* 507:81-87.

Warrick HM and Spudich JA. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol* 3:379-421.

Weber A, Pennise CR, Babcock GG, and Fowler VM. 1994. Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *J Cell Biol* 127:1627-1635.

Wells JA and Yount RG. 1979. Active site trapping of nucleotides by crosslinking two sulfhydryls in myosin subfragment 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4966-4970.

Wells L, Vosseller K, and Hart GW. 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291:2376-2378.

Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, and Hart GW. 2002b. 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, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, and Hart GW. 2002a. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* 1:791-804.

Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, and Hart GW. 2004. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J Biol Chem* 279:38466-38470.

Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, and Kudlow JE. 2006. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology* 16:551-563.

White SP, Cohen C, and Phillips GN, Jr. 1987. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 325:826-828.

Widrick JJ, Romatowski JG, Bain JL, Trappe SW, Trappe TA, Thompson JL, Costill DL, Riley DA, and Fitts RH. 1997. Effect of 17 days of bed rest on peak isometric force and unloaded shortening velocity of human soleus fibers. *Am J Physiol* 273:C1690-C1699.

Widrick JJ, Norenberg KM, Romatowski JG, Blaser CA, Karhanek M, Sherwood J, Trappe SW, Trappe TA, Costill DL, and Fitts RH. 1998. Force-velocity-power and force-pCa relationships of human soleus fibers after 17 days of bed rest. *J Appl Physiol* 85:1949-1956.

Widrick JJ, Knuth ST, Norenberg KM, Romatowski JG, Bain JL, Riley DA, Karhanek M, Trappe SW, Trappe TA, Costill DL, and Fitts RH. 1999. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J Physiol* 516 (Pt 3):915-930.

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.

Willadsen KA, Butters CA, Hill LE, and Tobacman LS. 1992. Effects of the amino-terminal regions of tropomyosin and troponin T on thin filament assembly. *J Biol Chem* 267:23746-23752.

Wolf H and Hofmann F. 1980. Purification of myosin light chain kinase from bovine cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5852-5855.

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.

Wrabl, J. O., Grishin, N. V. 2001. Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylases superfamily. *J. Mol. Biol.*, 314:365-374.

Wu QL, Jha PK, Raychowdhury MK, Du Y, Leavis PC, and Sarkar S. 1994. Isolation and characterization of human fast skeletal beta troponin T cDNA: comparative sequence analysis of isoforms and insight into the evolution of members of a multigene family. *DNA Cell Biol* 13:217-233.

Xie X, Harrison DH, Schlichting I, Sweet RM, Kalabokis VN, Szent-Gyorgyi AG, and Cohen C. 1994. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature* 368:306-312.

X

Xu C, Craig R, Tobacman L, Horowitz R, and Lehman W. 1999. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys J* 77:985-992.

Y

Yamamoto K. 1984. Characterization of H-protein, a component of skeletal muscle myofibrils. *J Biol Chem* 259:7163-7168.

Yamashita-Goto K, Okuyama R, Honda M, Kawasaki K, Fujita K, Yamada T, Nonaka I, Ohira Y, and Yoshioka T. 2001. Maximal and submaximal forces of slow fibers in human soleus after bed rest. *J Appl Physiol* 91:417-424.

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 U S A* 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.

Yang Z, Stull JT, Levine RJ, and Sweeney HL. 1998. Changes in interfilament spacing mimic the effects of myosin regulatory light chain phosphorylation in rabbit psoas fibers. *J Struct Biol* 122:139-148.

Yao 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, Daniels MC, Virkamaki A, Makimattila S, DeFronzo RA, and McClain D. 1996. Increased glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in skeletal muscle of patients with NIDDM. *Diabetes* 45:302-307.

Yki-Jarvinen H and Makimattila S. 1997. Insulin resistance due to hyperglycaemia: an adaptation protecting insulin-sensitive tissues. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S141-S144.

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.

Yonemura I, Hirabayashi T, and Miyazaki J. 2000. Heterogeneity of chicken slow skeletal muscle troponin T mRNA. *J Exp Zool* 286:149-156.

Yonemura I, Mitani Y, Nakada K, Akutsu S, and Miyazaki J. 2002. Developmental changes of cardiac and slow skeletal muscle troponin T expression in chicken cardiac and skeletal muscles. *Zoolog Sci* 19:215-223.

Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, and Vocadlo DJ. 2008. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* 4:483-490.

Z

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.

Zachara NE and Hart GW. 2006. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta* 1761:599-617.

Zhang, R., Zhao, J., Mandveno, A., Potter, J.D. 1995. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circ. Res.*, 76:1028–1035.

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.

Zhi G, Ryder JW, Huang J, Ding P, Chen Y, Zhao Y, Kamm KE, and Stull JT. 2005. Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17519-17524.

Zhivkov V, Tosheva R, and Zhivkova Y. 1975. Concentration of uridine diphosphate sugars in various tissues of vertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 51:421-424.

Zierath JR. 1995. In vitro studies of human skeletal muscle: hormonal and metabolic regulation of glucose transport. *Acta Physiol Scand Suppl* 626:1-96.

Zot AS and Potter JD. 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16:535-559.

Zot HG and Potter JD. 1982. A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J Biol Chem* 257:7678-7683.

Résumé

La *O*-N-acétylglucosaminylation ou *O*-GlcNAc, est une glycosylation cytosolique et nucléaire correspondant à l'addition d'un motif *O*-GlcNAc sur des résidus sérine et thréonine des protéines. Cette glycosylation dynamique et réversible est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, le cycle cellulaire, la signalisation intracellulaire... mais également dans des pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives et le diabète. Peu de travaux se sont intéressés au rôle que la *O*-GlcNAc pourrait jouer dans le muscle strié. Pourtant, le muscle squelettique est un modèle intéressant pour l'étude de la *O*-GlcNAc, puisque son métabolisme dépend fortement du glucose, que de nombreux processus musculaires, tels que la contraction, dépendent de la phosphorylation et qu'il peut adapter son métabolisme énergétique aux conditions physiologiques. Or, la *O*-GlcNAc est à la fois dépendante du taux de glucose mais peut également interférer avec la phosphorylation par l'intermédiaire d'une balance phosphorylation/ *O*-N-acétylglucosaminylation.

Nous avons identifié un grand nombre de protéines modifiées par la *O*-GlcNAc, en particulier les chaînes lourdes et légères de myosine, l'actine et la tropomyosine. L'analyse du rôle de la *O*-GlcNAc sur l'activité contractile, et en particulier sur la sensibilité calcique des fibres musculaires, démontre que cette glycosylation pourrait jouer un rôle modulateur dans l'activité contractile des fibres musculaires via des interactions protéine-protéine mais également des motifs qui ne sont pas engagés dans des interactions. Nous avons identifié plusieurs sites *O*-GlcNAc sur deux protéines clés de la machinerie contractile du muscle squelettique, l'actine et la myosine. Un site a été localisé sur la séquence 198-207 de l'actine et quatre autres ont été identifiés dans la partie hélicoïdale de la région carboxy-terminale de la myosine et correspondent aux séquences 1094-1106 ; 1295-1303 ; 1701-1712 ; 1913-1922. Ces sites pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine, dans la polymérisation des protéines et également jouer un rôle dans la modulation des propriétés contractiles du muscle squelettique. Enfin, nous mettons en évidence la possible implication de la *O*-GlcNAc dans un modèle d'atrophie fonctionnelle (Bed-rest) chez l'humain. En premier lieu, nous avons démontré l'existence d'une balance phosphorylation/*O*-GlcNAc de la MLC₂ au cours de l'atrophie musculaire. Cette balance pourrait moduler l'activité ou les propriétés de cette protéine au rôle important dans la modulation de la force de contraction. En outre, l'analyse du taux global de *O*-GlcNAc suggère que le taux de *O*-GlcNAc est lié au développement de l'atrophie musculaire. L'ensemble de ces résultats démontre que la *O*-GlcNAc joue un rôle qui pourrait être tout autant important dans la physiologie musculaire que la phosphorylation.

Mots-clés : *O*-GlcNAc, contraction musculaire, protéines contractiles, myosine, actine, atrophie musculaire, bed-rest, phosphorylation, balance.

Abstract : Functional and proteomic analysis of role of O-N-Acetylglucosaminylation in skeletal muscle physiology

The *O*-linked N-acetylglucosaminylation termed *O*-GlcNAc is a dynamic cytosolic and nuclear glycosylation on serine and threonine residus. This dynamic and reversible glycosylation is involved in many physiological as well as pathological processes such as diabetes, neurodegenerative diseases, cancer or cardiac ischemia. Only few studies have been performed about the role of *O*-GlcNAc in skeletal muscle.

However, the skeletal muscle is an interesting model to study the *O*-GlcNAc since i) its metabolism depends on glucose, ii) many muscular processes such as contraction are dependent on phosphorylation, and iii) there is a plasticity of the muscle metabolism depending on the physiological conditions. *O*-GlcNAc is dependent also on the level of glucose and can interfere with phosphorylation through a phosphorylation/glycosylation balance.

We clearly demonstrated that a number of key contractile proteins i.e myosin heavy and light chains and actin are *O*-GlcNAc modified. The role of this post-translational modification in the contractile properties was investigated by establishing T/pCa curves on skinned fibers. This study demonstrated that *O*-GlcNAc moieties involved in protein-protein interactions or not could modulate calcium activation properties and therefore that *O*-GlcNAc motifs could be involved in the modulation of contractile force. Using a mass spectrometry-based method, we determined the localization of one *O*-GlcNAc site in the subdomain 4 of actin (séquence 198-207) and four *O*-GlcNAc sites in the light meromyosin region of myosin heavy chains (séquences 1094-1106 ; 1295-1303 ; 1701-1712 ; 1913-1922). These sites might be involved in protein-protein interactions or in the polymerization of MHC or could modulate the contractile properties of skeletal muscle. Finally, we studied the implication of *O*-GlcNAc in a human model of muscle atrophy (Bed-Rest). We demonstrated the existence of a phosphorylation/*O*-GlcNAc balance for MLC₂ that could modulate the activity and properties of this protein which has a key role in the modulation of force. Moreover, our data suggested that *O*-GlcNAc level might be involved in the control of protein homeostasis and muscular atrophy in human as in rat. All these data demonstrate that *O*-GlcNAc is an important post-translational modification in the muscle physiology.

Key-words: *O*-GlcNAc, muscular contraction, contractile proteins, myosin, actin, muscular atrophy, bed-rest, phosphorylation, interplay.