



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Repérage immunologique d'une phosphofructokinase (PFK1) branchiale phosphorylable du crabe *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards

Ligot, Xavier

Award date:
1988

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Repérage immunologique d'une phosphofructokinase (PFK₁)
branchiale phosphorylable du crabe *Eriocheir sinensis*
H. Milne-Edwards.

Xavier LIGOT
1987 - 1988

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Faculté des Sciences

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081 - 22.90.61 Telex 59222 facnam Téléfax 081 - 23.03.91

**Repérage immunologique d'une phosphofructokinase (PFK₁)
branchiale phosphorylable du crabe *Eriocheir sinensis* H. Milne-
Edwards.**

Xavier LIGOT

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité glycolytique chez les crustacés.

Nous avons montré que la fraction cellulaire soluble dans les branchies antérieures et postérieures du crabe chinois euryhalin *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce (dans notre laboratoire), présente une activité phosphofructokinase (PFK₁).

Nous avons prouvé par des techniques d'électrophorèse et d'autoradiographie que des protéines branchiales peuvent être phosphorylées par des protéines kinases A d'origine mammalienne et que l'une d'entre elles pourrait correspondre à la PFK₁.

Afin d'identifier cette protéine, nous avons utilisé une approche immunologique qui nous a permis d'obtenir un sérum polyclonal monospécifique de la PFK₁ du muscle squelettique de lapin.

Cette sonde constitue vraisemblablement un outil performant pour la détection de la PFK₁ branchiale, phosphorylée ou non suivant les conditions physiologiques de l'animal.

Content

Our purpose is to investigate the physiological importance of proteins phosphorylation in the regulation of glycolysis among crustaceans.

The existence of a phosphofructokinase (PFK₁) located in the cytosol of the anterior and posterior gills of the euryhalin crab *Eriocheir sinensis* adapted to fresh water is demonstrated.

By using the technics of electrophoresis and autoradiography, we prove that the branchial proteins can be phosphorylated via a protein kinase A of mammalian origin. One of these may correspond to PFK₁

An immunological approach is used for its identification. It provides us with a polyclonal serum monospécific for the PFK₁ of rabbit skeletal muscle. This probe is likely a efficient tool for detecting the branchial PFK₁, either phosphorylated or not depending on the physiological condition of the crab.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1988

Laboratoire d'endocrinologie et d'hématologie comparées

Promoteur : Professeur P. Devos.

Au terme de cette année, je tiens à remercier tout particulièrement le Révérend Père P. Devos, promoteur de ce mémoire, pour ses conseils et ses encouragements.

Je ne voudrais pas clôturer ce travail sans exprimer ma profonde reconnaissance à Marie-Ange Benoit pour l'extraordinaire disponibilité dont elle a fait preuve.

Toute ma gratitude s'adresse également aux personnes qui ont permis la réalisation de ce travail et notamment, à celles du laboratoire de Biologie Animale.

Un très grand merci à Pascal Debauche pour la dactylographie du mémoire.

Je n'oublierai pas mes parents qui m'ont apporté leur chaleureux soutien.

1. Introduction.

Préambule.....	p. 1
Chapitre 1. La Glycolyse.....	p. 2
1.1- La glycolyse chez les vertébrés.....	p. 2
1.2- La glycolyse chez les organismes autres que les vertébrés.....	p. 3
1.2.1- En général	p. 3
1.2.2- Chez les crustacés.....	p. 3
1.3- Le contrôle de la glycolyse : un modèle de régulation métabolique.....	p. 5
Chapitre 2 - La phosphofructokinase (PFK ₁).....	p. 6
2.1- La PFK ₁ dans les différents organismes vivants.....	p. 7
2.1.1- Dans les tissus animaux.....	p. 7
2.1.2- Chez les champignons.....	p. 8
2.1.3- Chez les plantes, protistes et bactéries.....	p. 9
2.1.4- La PFK ₁ des arthropodes et des mollusques.....	p. 10
2.2- Les isoenzymes.....	p. 11
2.3- Régulation.....	p. 12
2.3.1- La phosphorylation.....	p. 13
A. Introduction.....	p. 13
B. Kinases susceptibles de phosphoryler la PFK ₁	p. 14
C. Signification de la phosphorylation de la PFK ₁ - Influences éventuelles sur les propriétés cinétiques.....	p. 16
D. Rôle de la phosphorylation dans le contrôle hormonal de l'activité de la PFK ₁	p. 20
Chapitre 3 - La régulation ionique et osmotique : rôle de la branchie.....	p. 24
3.1- Osmolalité chez les crustacés.....	p. 24
3.1.1- Introduction.....	p. 24
A. La respiration.....	p. 24
B. La régulation osmotique et ionique.....	p. 24
3.1.2- Organes inclus dans l'osmorégulation.....	p. 25
A. Tube digestif.....	p. 25
B. Les glandes antennaires.....	p. 26
3.1.3- La branchie comme organe osmorégulateur.....	p. 26
A. Aspects structuraux.....	p. 26
B. Aspects physiologiques.....	p. 27
C. Osmorégulation et métabolisme énergétique.....	p. 28
3.1.4- La branchie comme cible de facteurs hormonaux et des bioamines.....	p. 28
A. Facteurs hormonaux.....	p. 29
B. Bioamines.....	p. 29
Chapitre 4 - Objectifs du mémoire.....	p. 31

2. Matériel et méthodes.

Liste des produits utilisés.....	p. 32
1- Matériel biologique.....	p. 34
1.1- Position systématique.....	p. 34
1.2- Stabulation des animaux.....	p. 34
2- Prélèvement des organes.....	p. 34
3- Préparation des tissus.....	p. 34
3.1- Homogénéisation.....	p. 34
3.2- Milieu d'homogénéisation.....	p. 34
3.3- Précipitation des protéines au TCA.....	p. 35
4- Immunisation des rats.....	p. 35
4.1- Les anticorps.....	p. 35
4.2- Injection des rats.....	p. 36
5- Dosages.....	p. 37
5.1- Définition des unités enzymatiques.....	p. 37
5.2- Dosage des protéines.....	p. 37
5.2.1- Folin.....	p. 37
5.2.2- Bradford.....	p. 38
5.3- Mesure de l'activité de la PFK ₁	p. 38
6- Techniques biochimiques.....	p. 39
6.1- Méthode de phosphorylation "in vitro" par une protéine kinase exogène.....	p. 39
6.2- Préparation des échantillons pour l'électrophorèse.....	p. 41
6.3- Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS).....	p. 41
6.4- Electrophorèse SDS-PAGE en gradient (6,25 - 13,5 %).....	p. 43
6.5- Coloration des gels.....	p. 44
6.6- Sèchage des gels.....	p. 44
6.7- Autoradiographies.....	p. 45
7- Techniques biochimiques et immunologiques.....	p. 45
7.1- Le "Dot-blot".....	p. 45
7.2- Test ELISA.....	p. 45
7.3- "Western blot" (blotting).....	p. 46
7.4- "Immunoblot".....	p. 46
7.5- Electro-élution.....	p. 47
7.6- Préparation d'un gel d'affinité.....	p. 47

3. Résultats.

Chapitre 1- Etude cinétique.....	p. 48
1.1- Activité phosphofructokinasiq. dans les branchies d' <i>Eriocheir sinensis</i> acclimaté à l'eau douce.....	p. 48
1.1.1- Effet dose-réponse.....	p. 48
1.1.2- Caractère soluble de l'enzyme branchial.....	p. 48
1.1.3- Effet du pH.....	p. 49
1.2- Caractérisation de la PFK ₁ branchiale.....	p. 49
1.2.1- Effet de la concentration en Fru-6-P.....	p. 50
1.2.2- Effet de la concentration en Mg-ATP.....	p. 51
1.3- Modulation de l'enzyme branchial.....	p. 51
1.3.1- Effet des concentrations physiologiques en ATP.....	p. 52
1.3.2- Effet du citrate.....	p. 52
1.3.3- Effet de l'AMP et de l'ADP.....	p. 53
1.4- Conclusions.....	p. 55
 Chapitre 2- Phosphorylation.....	 p. 56
2.1- Phosphorylation de protéines branchiales par une protéine kinase A mammalienne : approche quantitative.....	p. 56
2.2- Analyse quantitative des protéines phosphorylées.....	p. 57
2.3- Conclusions.....	p. 58
Chapitre 3- Sonde immunologique.....	p. 59
3.1- Détection d'anticorps anti-PFK _M de lapin.....	p. 59
3.1.1- Analyse qualitative par Dot-blot des Ac éventuellement produits.....	p. 59
3.1.2- Analyse quantitative des Ac.....	p. 59
3.2- "Comportement" de ces Ac en présence de protéines branchiales.....	p. 60
3.3- Examen des protéines reconnues par l'Ac au moyen de l'immunoblot.....	p. 60
3.3.1- Sur la PFK _M	p. 60
3.3.2- Sur les protéines branchiales.....	p. 61
3.4- Production d'anticorps monospécifiques à partir du sérum préexistant.....	p. 62
3.4.1- Visualisation du degré de purification de la PFK _M après électro-élué.....	p. 62
3.4.2- Vérification par Dot-blot de la reconnaissance par l'anticorps de la PFK _M électro-éluée.....	p. 62
3.4.3- Greffage de la protéine sur un gel d'affinité.....	p. 63
3.4.4- Examen de la fraction éluée à partir du gel d'affinité..	p. 63
3.5- Analyse des Ac obtenus par injection de la PFK _M	

Table des matières

électro-éluée.....	p. 63
3.5.1- Analyse qualitative par la méthode du Dot-blot.....	p. 63
3.5.2- Analyse quantitative par la méthode ELISA.....	p. 64
3.5.3- Examen des protéines reconnues par le nouvel Ac au moyen de l'immunoblot.....	p. 64
3.5.4- Visualisation de l'état de purification de la PFK _M électro-éluée par coloration à l'argent d'un gel SDS-PAGE.....	p. 64
3.6- Origine des bandes artéfactuelles.....	p. 65
3.6.1- Etude du pattern électrophorétique de la PFK _M et des protéines branchiales avec et sans réducteur.....	p. 65
3.6.2- Influence des réducteurs sur l'apparition des bandes parasites en immunoblot.....	p. 65
3.7- Les Ac anti-PFK _M reconnaissent des protéines branchiales (branchies antérieures et postérieures) de ± 77.000.....	p. 65
3.8- Conclusions.....	p. 66
Chapitre 4 - Discussion générale et perspectives.....	p. 67
Bibliographie	p. 69

INTRODUCTION

LISTE DES ABREVIATIONS USUELLES.

- 1 Ac = anticorps.
- 2 ADP = adénosine-5' -diphosphate.
- 3 Ag = antigène.
- 4 AMP = adénosine-5' -monophosphate.
- 5 AMPc = AMP cyclique.
- 6 GMPc = GMP cyclique.
- 7 ATP = adénosine-5' -triphosphate.
- 8 BA = branchies antérieures.
- 9 BP = branchies postérieures.
- 10 BSA = albumine sérique bovine.
- 11 ΔG° = échange d'énergie libre standard à pH 7,0.
- 12 FBPase _{1(ou 2)} = fructose -1(ou 2),6- bisphosphatase.
- 13 Fru-1,6-P₂ = fructose -1,6-bisphosphate.
- 14 Fru-2,6-P₂ = fructose -2,6-bisphosphate.
- 15 Fru-6-P = fructose -6- phosphate.
- 16 Glc-1,6-P₂ = glucose -1,6- bisphosphate.
- 17 Glc-6-P = glucose -6-phosphate.
- 18 GMP = guanosine -5'- monophosphate.
- 19 GTP = guanosine -5'- triphosphate.
- 20 HK = hexokinase.
- 21 I = Immun.
- 22 I_{0,5} = concentration en inhibiteur produisant 50 % de l'inhibition maximale.
- 23 K_a = constante d'activation.
- 24 Kcal = Kilocalorie.
- 25 K_m = constante de Michaelis.
- 26 LDH = lactate déshydrogénase.
- 27 mM = millimolaire.
- 28 NAD⁺ = nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée).
- 29 NADH = nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite).
- 30 PEP = phosphoénolpyruvate.
- 31 PGM = phosphoglycérate mutase.
- 32 P_i ou PO₄³⁻ = phosphate inorganique.
- 33 Pi = Préimmun.
- 34 PFK₁ = 6-phosphofructo- 1 -kinase.
- 35 PFK_L = PFK₁ du foie.
- 36 PFK_M = PFK₁ du muscle squelettique.
- 37 PK = pyruvate kinase.
- 38 PM = poids moléculaire.
- 39 R_f = mobilité relative.
- 40 μ M = micromolaire.
- 41 V = vitesse.
- 42 V_{max} = vitesse maximale (calculée par l'équation de Lineweaver-Burk et/ou de Headie-Hofstee).

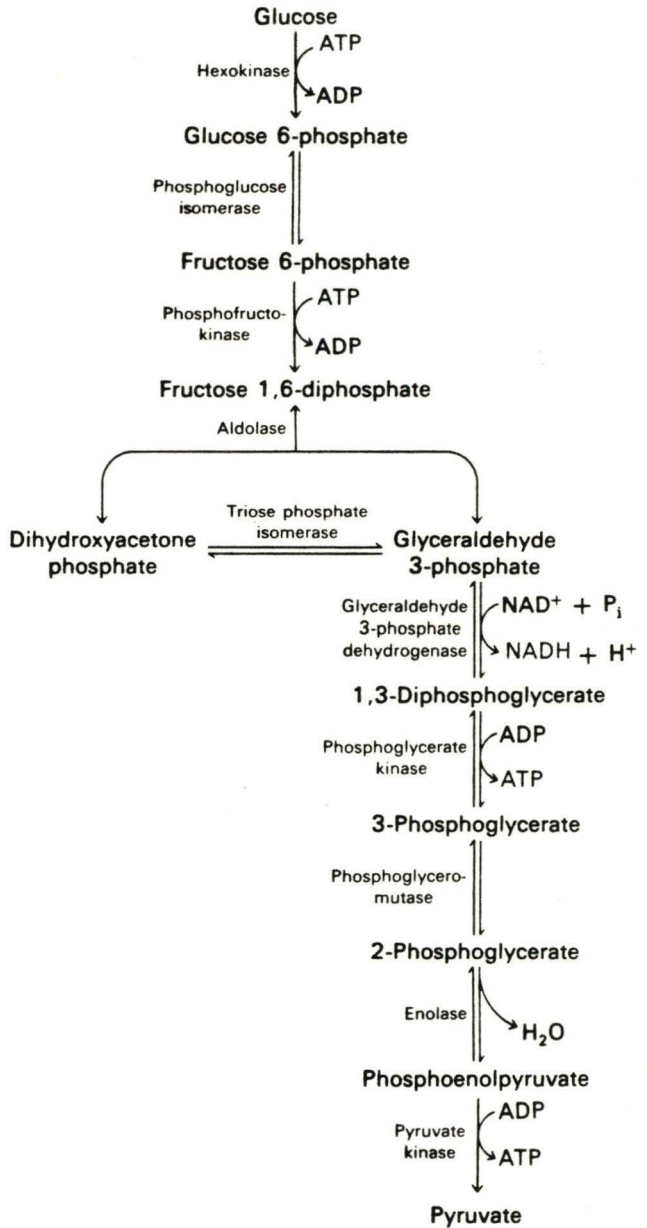


Fig. 1 : La voie glycolytique [2].

Préambule.

Puisque les premiers organismes vivants ont probablement vécu dans une atmosphère privée d'oxygène, la fermentation anaérobie représente le mécanisme biologique le plus primitif et le plus universel pour produire de l'énergie.

Les organismes aérobies actuels ont gardé cette possibilité de produire de l'énergie à partir du glucose ou de ses dérivés par glycolyse anaérobie. Cette voie dégradative qui aboutit à la formation de pyruvate représente pour eux une étape préparative au catabolisme aérobie du glucose.

Bien que l'étude de la glycolyse chez les crustacés se soit fortement développée ces dix dernières années, on connaît encore peu de choses sur la régulation des enzymes glycolytiques et notamment celle de la phosphofructokinase chez ces invertébrés. Ainsi, voulons-nous par ce travail sur *Eriocheir sinensis*, tenter de contribuer au lent décryptage du contrôle de cette voie catabolique intermédiaire.

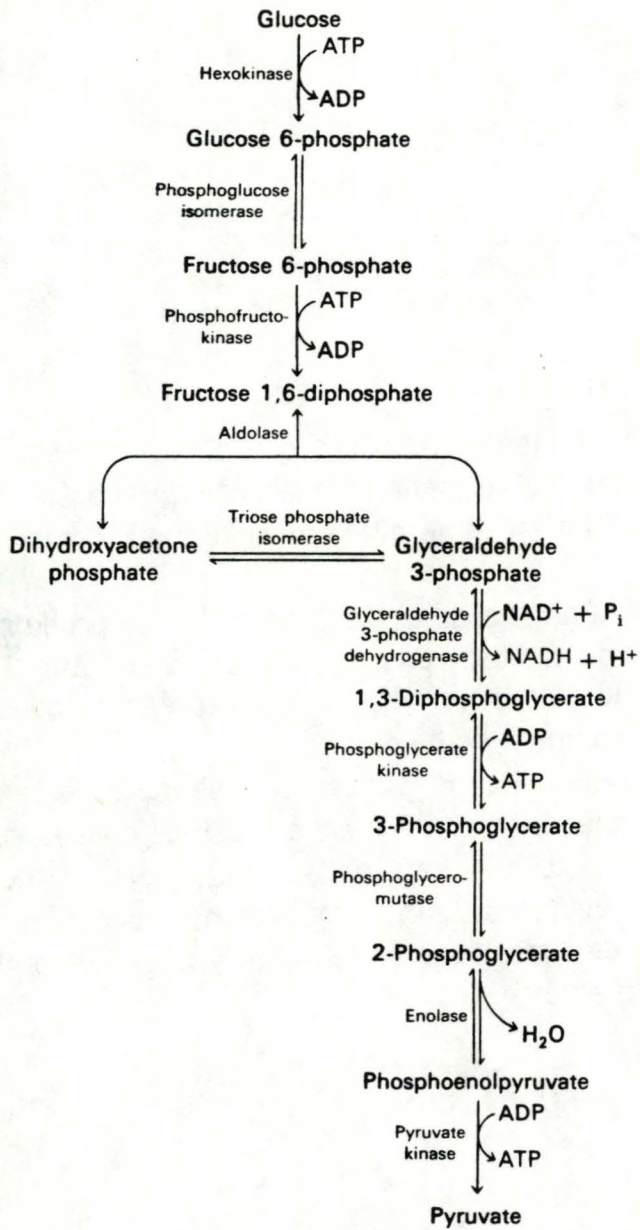


Fig. 1 : La voie glycolytique [2].

Chapitre 1: La Glycolyse.

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof est l'ensemble des réactions qui convertissent le glucose en pyruvate (fig.1). Elle a été la 1ère grande voie enzymatique élucidée. Les enseignements qui sont sortis de cette étude ont ouvert de nouveaux horizons et des voies d'approche originales à l'étude des modes de régulation et celle du métabolisme intermédiaire [1].

Nous distinguerons dans l'examen de cette voie enzymatique les vertébrés des autres organismes, étant donné le grand nombre d'études réalisées plus particulièrement sur les mammifères.

1.1 La glycolyse chez les vertébrés.

Son rôle est double : elle dégrade le glucose pour générer de l'ATP et elle fournit le squelette carboné pour la synthèse des composants cellulaires.

Chez les organismes aérobies, la glycolyse est le prélude au cycle de l'acide citrique et à la chaîne de transport des électrons dans lesquels 94% de l'énergie du glucose est récoltée sous forme d'ATP. Nous n'en reprenons ici que les étapes principales .

Le glucose est d'abord converti en Fru-1,6-P₂ via une première phosphorylation, une isomérisation et une seconde phosphorylation avec consommation de deux molécules d'ATP. Le Fru-1,6-P₂ est ensuite clivé par l'aldolase en dihydroxyacétone phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate, lesquels sont facilement interconvertibles. Le glycéraldéhyde-3-phosphate est alors oxydé et phosphorylé pour former le 1,3-diphosphoglycérate, un acyl phosphate avec un potentiel de transfert de phosphate élevé ($\Delta G \cdot = -4,5 \text{ Kcal.mole}^{-1}$). La formation de 3-phosphoglycérate entraîne la production d'une molécule d'ATP. Au terme de la glycolyse, le phosphoénolpyruvate, un second intermédiaire riche en énergie ($\Delta G \cdot = -7,5 \text{ Kcal.mole}^{-1}$), est formé par transfert d'un phosphoryl et déshydratation. Sa conversion en pyruvate entraîne la formation d'un second ATP. Il y a finalement gain net de deux molécules d'ATP suite à la glycolyse d'une molécule de glucose.

Comme l'accepteur d'électrons dans l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate est le NAD⁺, celui-ci doit être constamment régénéré. Chez les organismes aérobies, cette opération se réalise par transfert d'électrons à l'oxygène. Dans des conditions anaérobies, le NAD⁺ est régénéré par réduction du pyruvate en lactate [2].

A. ANAEROBIC GLYCOLYSIS

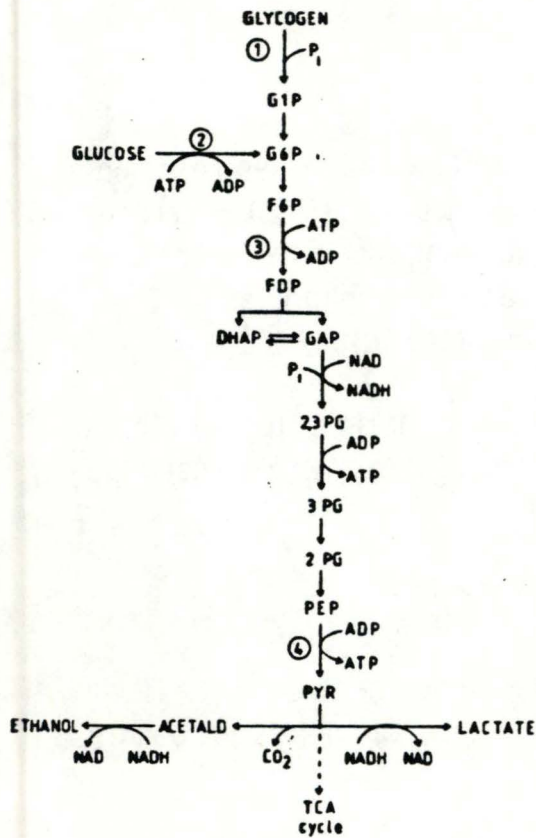


Fig. 2a : Fermentation [3].

B. GLYCOLYSIS WITH ALTERNATIVE END PRODUCTS

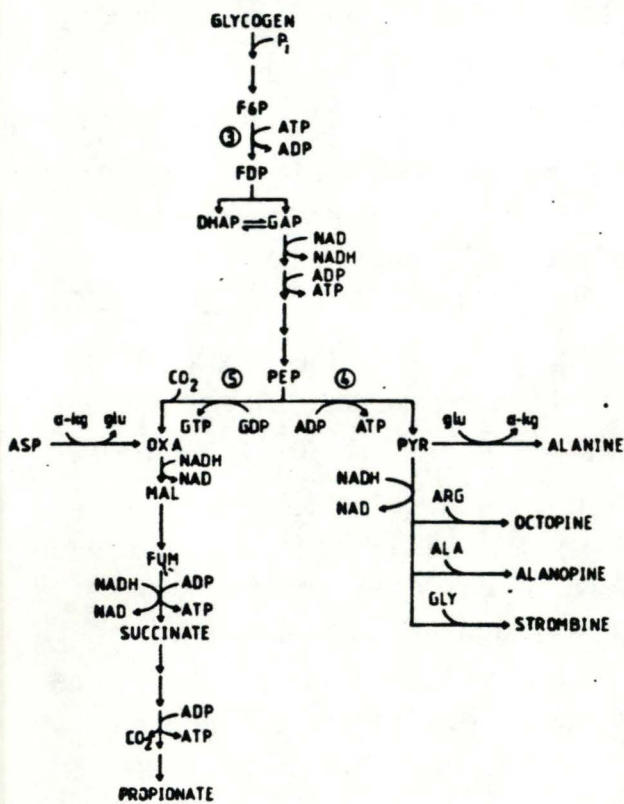


Fig. 2b : La glycolyse chez les invertébrés : formation de métabolites particuliers [3].

1.2 La glycolyse chez les organismes autres que les vertébrés.

1.2.1 En général .

Les voies métaboliques du catabolisme des hydrates de carbone y sont semblables à celles décrites pour les vertébrés. Cependant, nombreux sont ceux qui, en conditions d'hypoxie, ont mis au point des systèmes particuliers pour régénérer le NAD^+ et produire des liaisons riches en énergie.

Ainsi, chez certains microorganismes, il y a synthèse du lactate ou d'éthanol à partir du pyruvate. Ces deux processus sont appelés fermentation (fig.2a) [2]. Par ailleurs, la glycolyse aboutit à la formation de métabolites tels que le succinate, l'alanine et trois produits de condensation du pyruvate avec des acides aminés (glycine, alanine, arginine) appelés opines (strombine, alanopine et octopine) (fig. 2b) [3].

Voici quelques aspects de ces systèmes particuliers.

Chez le bivalve intertidal *Crassostrea virginica* (l'huître) et les mollusques bivalves *Venus gallina* et *Scapharca inequivalvis*, les produits terminaux de la glycolyse anaérobie sont le succinate et la L-alanine. Chez les helminthes parasites comme l'*Ascaris lumbricoïdes*, il y a également une accumulation de succinate directement proportionnelle au travail musculaire [4,5]. Ce sont par contre des opines qui sont produites chez les trois vers suivants : *Arenicola marina*, *Cardium tuberculatum* et *Sipunculus nudus* et chez le mollusque bivalve (lamellibranche) *Mytilus edulis* (la moule) [6,7,8]. Certains organismes tels que l'*Ascaris lumbricoïdes*, la douve *Fasciola hepatica*, le ver *Arenicola marina* et la moule *Mytilus edulis*, accumulent le propionate aussi bien que le succinate dans les conditions anaérobies [4,6].

1.2.2 Chez les crustacés .

Le fonctionnement de la glycolyse est maintenant bien connu chez les crustacés.

Beaucoup d'auteurs se sont intéressés aux enzymes glycolytiques de ceux-ci et ont essayé de les comparer aux enzymes des vertébrés. Il ressort de leurs travaux que tous ceux qui sont présents chez les vertébrés se retrouvent chez les crustacés. Les mécanismes régulateurs de ces enzymes sont également similaires à ceux des mammifères [9].

Néanmoins, il existe certaines particularités liées au cycle de mue, à l'adaptation métabolique et à l'apparition de certains produits terminaux chez ces animaux.

Ainsi, pendant l'intermue de l'écrevisse, *Pacifastacus leniusculus*, la glycolyse est considérée comme la voie prédominante du catabolisme des hydrates de carbone [10]. Par contre, chez l'écrevisse, *Orconectes virilis* et chez le crabe, *Paratelphusa hydrodromus*, c'est le cycle des pentoses phosphates qui prédomine pendant cette période, la glycolyse étant plus importante pendant la mue [11,12,13].

En hypoxie, chez les crustacés (et arthropodes insectes), la dégradation des phosphagènes et la glycolyse anaérobie avec formation d'acide lactique, sont les principales sources d'énergie. L'existence de la voie succinate-propionate n'y a pas été mise en évidence [6].

L'adaptation métabolique du crabe *Limulus polyphemus* diffère pendant le travail musculaire et pendant l'hypoxie environnementale. En exercice, il y a diminution de la concentration en arginine phosphate et formation du D-lactate dans le tissu musculaire. Tandis qu'en anaérobiose expérimentale, il se produit une diminution du glycogène, de l'arginine phosphate et une accumulation d'arginine, du D-lactate et d'alanine dans le muscle et l'hépatopancréas [14].

La glycolyse a également été étudiée chez le homard, *Homarus vulgaris* principalement au niveau du muscle de l'abdomen et de celui de la pince. Elle diffère selon la disponibilité en oxygène. En aérobiose, le métabolisme du muscle de la pince est plus oxydatif que celui du muscle abdominal. En anaérobiose, le muscle abdominal accumule une grande quantité de L-lactate tandis que celui de la pince produit de la L-alanine [15].

Il faut aussi signaler qu' *Artemia salina*, un crustacé hyperrégulateur, mis en eau douce, développe dans ses glandes à sels (ou organes de Neck) une anaérobiose facultative aboutissant à la formation de succinate [16].

Dans les branchies du crabe *Carcinus maenas*, le glucose est métabolisé de façon prédominante en alanine, sucres phosphates et acide lactique, avec très peu d'incorporation dans les intermédiaires du cycle de l'acide citrique [17].

En résumé, si on considère l'ensemble des invertébrés, ce sont les mollusques et annélides qui présentent le potentiel optimum de glycolyse anaérobie via la production de substances qu'on ne retrouve pas ailleurs. Quant aux arthropodes, crustacés et insectes, s'ils sont capables de survivre en conditions d'hypoxie prolongée, ils ne sont pas d'aussi bons anaérobies que les précédents [6].

En conclusion, lorsqu'un organisme est en pleine activité, la quantité d'oxygène fournie via le liquide sanguin peut être insuffisante pour satisfaire la demande de tous les tissus (saturation des transporteurs d'oxygène).

Face à une situation aussi défavorable, les animaux ont recours à la régulation du débit sanguin pour assurer un apport accru d'hydrates de

carbone vers les tissus qui en ont besoin, tels le coeur et les muscles. En conséquence, ils peuvent fort bien supporter un travail musculaire intense en utilisant la glycolyse anaérobie. Le bilan énergétique de celle-ci permet la survie des organismes, vertébrés et autres, dans des milieux anoxiques.

Tout ceci suppose des mécanismes de contrôle très élaborés que nous allons examiner dans le paragraphe suivant.

1.3 Le contrôle de la glycolyse : un modèle de la régulation métabolique.

Les réactions glycolytiques sont aisément réversibles sauf celles catalysées par l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK_1) et la pyruvate kinase (PK) qui constituent donc trois lieux privilégiés de régulation : le premier assure la transformation du D-glucose en Glc-6-P (HK), le second catalyse la transformation du Fru-6-P en Fru-1,6- P_2 (PFK_1) et, le troisième transforme le PEP en pyruvate (PK). Chacun de ces enzymes possède ses propres caractéristiques cinétiques et physicochimiques.

L'HK est inhibée de manière non compétitive par le produit de sa réaction, le Glc-6-P. Cette propriété est à la base d'un système de contrôle faisant intervenir le deuxième enzyme : la PFK_1 . En effet, une inhibition de la PFK_1 augmente la concentration du Fru-6-P et donc du Glc-6-P, ce qui diminue la phosphorylation du D-glucose. Inversement, une stimulation de la PFK_1 diminue la concentration en Glc-6-P, ce qui augmente la phosphorylation du glucose. Ce mécanisme de contrôle HK- PFK_1 permet entre autres de synthétiser du glycogène lorsque la glycolyse est inhibée. Nous venons d'évoquer le rôle de la PFK_1 dans la régulation de la glycolyse. Nous l'expliciterons dans le paragraphe suivant. Signalons seulement que cet enzyme est inhibé par une concentration élevée en ATP et en citrate et que cette inhibition peut être levée par l'AMP, le P_i , le Fru-1,6- P_2 ou le Fru-6-P.

Quant à la PK, qui constitue un autre site de contrôle, elle catalyse une réaction dont l'équilibre thermodynamique est tel qu'elle ne peut se dérouler que dans le sens de la formation d'ATP. Cependant, lorsque la charge énergétique de la cellule est élevée, l'enzyme est inhibé par ce nucléotide, ce qui peut provoquer une accumulation d'intermédiaires glycolytiques jusqu'au PEP [2].

Deux nouveaux concepts ont vu le jour dans la régulation de la voie

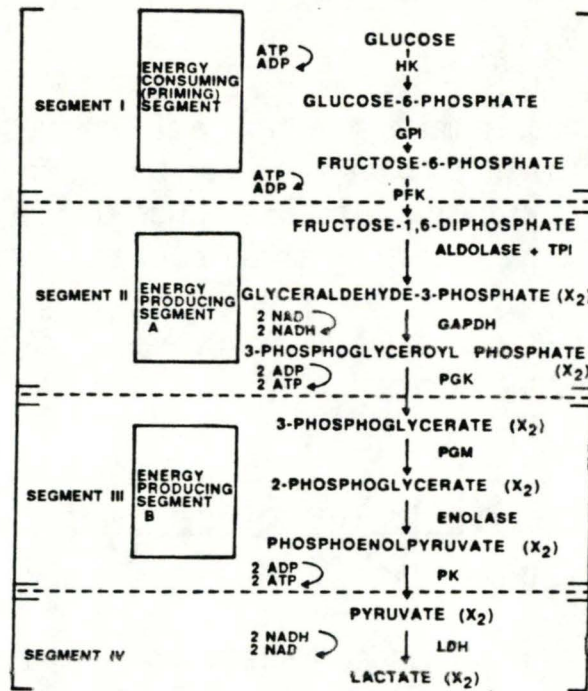


Fig. 3a : Représentation de la séquence glycolytique sous la forme d'une suite de "segments" [19].

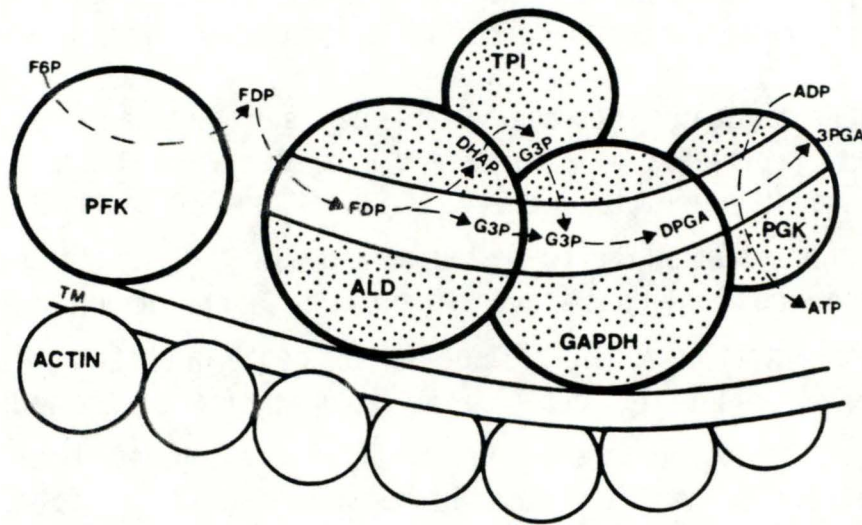


Fig. 3b : Représentation schématique d'un "segment" glycolytique lié au filament d'actine [19].

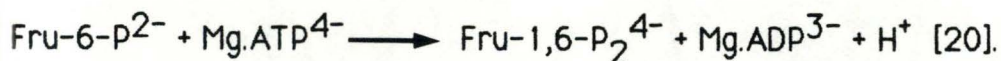
glycolytique. Le premier est la modification covalente des enzymes par phosphorylation, ce qui produit des formes moins actives de deux de ces trois régulateurs de la glycolyse, soit la PFK₁ et la PK. Nous détaillerons ultérieurement ce phénomène. Le second est l'association des enzymes de la glycolyse à la fraction particulaire de la cellule. De telles interactions principalement au niveau des filaments d'actine du cytosquelette, ont été observées dans tous les tissus et à tous les stades de développement de beaucoup d'organismes [18,19].

Ces observations ont permis d'élaborer un modèle qui considère la séquence glycolytique *in vivo* comme une suite de segments indépendants, constitués de "clusters" d'enzymes (fig. 3a et 3b). Ces segments se lient électrostatiquement aux structures subcellulaires à l'endroit où un besoin d'énergie se fait sentir. Cette liaison réversible et très rapide confère aux enzymes des caractéristiques cinétiques distinctes de celles observées lorsqu'ils sont en solution. Il s'agit d'un nouveau type de compartimentation du cytoplasme appelé "compartimentation matricielle". La conjugaison des deux phénomènes que sont la segmentation et la compartimentation permet à la cellule une plus grande flexibilité et un meilleur contrôle de cette importante aire du métabolisme qu'est la glycolyse.

Passons maintenant à l'étude d'un enzyme-clé de la voie d'Embden-Meyerhof.

Chapitre 2: La phosphofructokinase (PFK₁)

La PFK₁, considérée comme l'enzyme-clé de la glycolyse, catalyse la formation du Fru-1,6-P₂ et d'ADP à partir du Fru-6-P et d'ATP selon l'équation suivante :



Contrôlant la première étape irréversible de la glycolyse (nommée pour cette raison "committed step"), la PFK₁ est véritablement le "pacemaker" de cette voie métabolique. L'HK ne peut en effet jouer ce rôle car le produit de son action, le Glc-6-P est également convertible en glycogène ou oxydable via la voie des pentoses phosphates [2]. Deux propriétés cinétiques caractérisent la plupart des PFK₁ : l'inhibition par un excès d'ATP et la forme sigmoïdale de leur courbe de saturation pour le Fru-6-P. De plus, la PFK₁ est le prototype même de l'enzyme multimodulé: elle possède en effet un large éventail de régulateurs positifs, qui tendent à faire disparaître les deux propriétés citées précédemment et de régulateurs négatifs qui les

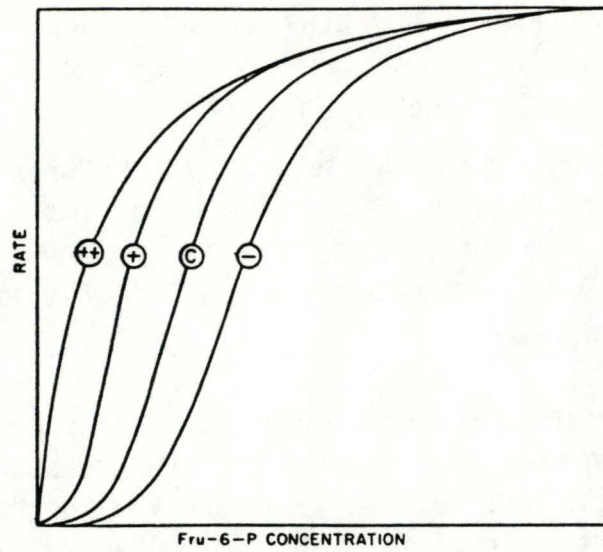


Fig. 4 : Représentation schématique de l'effet des activateurs et des inhibiteurs de la PFK₁ sur la courbe de saturation du Fru-6-P [21].

-: Inhibiteurs.

c: Absence d'effecteurs.

+: Effecteurs positifs (désinhibiteurs).

++: Grande quantité d'effecteurs positifs (désinhibiteurs).

accentuent (fig.4). En règle générale, la PFK₁ de procaryotes est contrôlée par un plus petit nombre d'effecteurs que celle d'organismes supérieurs [22]. D'autre part, les propriétés cinétiques de l'enzyme sont modifiées en fonction de sa propre concentration; en effet, elle existe sous différentes formes polymériques résultant de réactions d'association-dissociation [23].

2.1 La PFK₁ dans les différents organismes vivants.

2.1.1 Dans les tissus animaux.

L'enzyme γ est typiquement un tétramère d'un PM d'environ 340.000. Différents isoenzymes, qui résultent de l'assemblage de plusieurs types de sous-unités, γ sont présents (voir point 2.2 "les isoenzymes"). Ils montrent des différences dans leur sensibilité à divers effecteurs et dans leur tendance à former des agrégats de haut PM. Cette dernière tendance est réprimée par l'ATP et augmentée par le Fru-6-P, le Fru-1,6-P₂ et le Fru-2,6-P₂. Ces agrégats semblent avoir une plus grande affinité pour le Fru-6-P que pour les tétramères isolés [24].

La PFK₁ est capable de réguler à elle seule la glycolyse. En effet, deux de ses principaux effecteurs négatifs signalent d'une part un excès d'énergie (l'ATP) et d'autre part, un excès d'éléments du squelette carboné (le citrate) [2].

Certaines caractéristiques des PFK₁ d'eucaryotes suggèrent que l'inhibition par l'ATP est fonction de la concentration en ions Mg²⁺. En effet, l'ATP libre est meilleur effecteur que le Mg-ATP : son affinité pour le site inhibiteur est dix fois supérieure à celle du Mg-ATP. Toutefois, l'inhibition produite par ce nucléotide peut être contrecarrée par l'AMP qui se lie à un site spécifique distinct de celui de l'ATP. La présence de ces deux sites fait de la PFK₁ le tampon de la charge énergétique de la cellule. Elle ajuste la mobilisation énergétique aux dépenses et elle maintient un approvisionnement stable en nucléotides à haute énergie (avec la contribution de l'adénylate cyclase et de la nucléotide diphosphate kinase) pour peut-être une centaine de réactions.

Par conséquent, la PFK₁ est un facteur essentiel dans l'homéostasie de la charge énergétique, celle-ci étant une acquisition majeure dans la régulation métabolique [22].

La PFK₁ subit une rétroinhibition par le citrate qui représente le second type d'effecteurs négatifs. Ce n'est pas le cas pour la PFK₁ de certains invertébrés tels que la douve *Fasciola hepatica* et la moule *Mytilus edulis*

[25,26]. Le glycérate-3-P et le PEP peuvent inhiber l'enzyme en se liant à ce même site d'inhibition. Quant au glycérate-2,3-P₂, il pourrait également se lier à ce site [22]

En résumé, on peut dire que la PFK₁ est plus active quand la cellule a besoin soit d'énergie, soit d'éléments de synthèse. Ceci étant signalé respectivement par un rapport ATP/AMP peu élevé et une faible concentration en citrate.

Certains **ions** modulent également l'activité de la PFK₁ des tissus animaux. Les ions NH₄⁺ en concentrations physiologiques (± 0,5 mM) peuvent activer la PFK₁ et ce, davantage en présence d'ions K⁺. Le P_i, étroitement relié au métabolisme énergétique, est un puissant activateur de l'enzyme; il agit en synergie avec l'AMP et de NH₄⁺ [22].

Il est bien connu que la PFK₁ est aussi stimulée par les trois **hexoses bisphosphates** que sont le Fru-1,6-P₂, le Glc-1,6-P₂ et le Fru-2,6-P₂. Seul le premier est un intermédiaire glycolytique; le troisième, quant à lui, est le régulateur le plus puissant de cet enzyme, il stimule toutes les PFK₁ animales testées. Ces trois hexoses bisphosphates n'ont pas d'effets synergiques : le Fru-1,6-P₂ par exemple, entre en compétition avec le Fru-2,6-P₂ pour le même site allostérique [24].

On a montré que l'enzyme du coeur mammalien est inhibé par l'aldolase. Cette inhibition serait due à la dissociation du Fru-1,6-P₂ d'un site d'activation de la PFK₁.

L'absence d'effet de l'aldolase sur l'activité phosphofructokinase de la douve, *Fasciola hepatica*, serait donc reliée au fait que cet hexose bisphosphate n'agit pas sur l'enzyme [25].

In vivo, la PFK₁ animale est très sensible aux petites variations de pH. Elle est fortement inhibée aux pH acides. De plus, on a découvert qu'un des deux substrats, le Fru-6-P, se lie préférentiellement aux formes non protonées via deux groupes ionisables. Il semble donc que l'inhibition par une diminution de pH observée dans les tissus anaérobiques permet probablement un ralentissement rétroactif de la glycolyse [22].

2.1.2 Chez les champignons.

La PFK₁ de **levure** diffère de celles de mammifères par plusieurs propriétés. C'est un octomère, composé de quatre sous-unités α (PM:120.000) et de quatre sous-unités β (PM:113.000).

Des études génétiques et biochimiques indiquent que les sous-unités α jouent un rôle régulateur tandis que les sous-unités β sont responsables de l'activité catalytique de l'enzyme. Bien que l'ATP et l'AMP aient les mêmes fonctions régulatrices que pour la PFK₁ mammalienne, le Fru-1,6-P₂ n'active pas l'enzyme de levure. Le Fru-2,6-P₂ est quant à lui un puissant stimulateur de l'enzyme. Il n'en diminue pas seulement le Km pour le Fru-6-P mais en plus, il augmente de deux à trois fois sa Vmax. L'AMP et le Fru-2,6-P₂ potentialisent mutuellement leurs effets : le Fru-2,6-P₂ augmente l'affinité de la liaison de l'enzyme à l'AMP.

Chez le champignon *Phycomyces blakesleeanus*, l'effet du Fru-1,6-P₂ est synergique avec ceux de l'AMP et du sulfate d'ammonium [24].

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il n'y a pas de différences dans le comportement cinétique *in situ* et *in vitro*. Ce parallélisme est relié au fait que l'enzyme de levure, contrairement à celui des tissus animaux, ne subit pas *in situ* de changement dans son degré de polymérisation, ce qui induit une activité accrue chez les autres organismes.

La PFK₁ de la levure, organismes ne produisant pas de H⁺ par sa fermentation alcoolique (par opposition à la fermentation lactique), n'est pas inhibée par une diminution de pH [22].

2.1.3 Chez les plantes, protistes et bactéries.

La différence fondamentale avec les autres organismes est l'absence d'un effet du Fru-2,6-P₂ sur la PFK₁ de plantes, de bactéries et du protozoaire *Trypanosoma brucei*.

Chez les **bactéries**, la PFK₁ est typiquement un tétramère composé de sous-unités de 40.000 de PM chacune, soit de taille deux fois plus petite que les sous-unités d'eucaryotes. L'idée que la sous-unité de la PFK₁ de mammifère (PM = 80.000) résulte d'une duplication d'un gène procaryotique, a été récemment appuyée par la découverte d'une homologie dans la structure primaire de la PFK₁ musculaire de lapin et ceux de l'enzyme de *Bacillus stearothermophilus*.

Les auteurs suggèrent qu'après la duplication du gène, un des sites catalytiques aurait perdu son activité pour devenir le site de liaison du Fru-2,6-P₂. L'absence d'effet de cet hexose bisphosphate sur l'enzyme bactérien ne peut qu'appuyer cette proposition. La PFK₁ de bactéries est différente de celle d'organismes eucaryotes à d'autres points de vue. Ainsi, sa rétroinhibition se produit par le PEP et non par l'ATP; elle est généralement activée par l'ADP ou bien l'AMP [24,27].

Chez le **protozoaire** *Trypanosoma cruzi*, on observe d'importantes différences dans la structure et les mécanismes de régulation de la PFK₁. Ainsi, des concentrations élevées en ATP n'inhibent pas l'enzyme; ceci est à mettre en rapport avec le catabolisme inhabituellement élevé des hydrates de carbone chez ce parasite [28].

2.1.4 La PFK₁ des arthropodes et des mollusques.

Fondamentalement, celle-ci n'est pas différente de celle des vertébrés. Citons seulement quelques particularités de l'enzyme ou de sa régulation.

Chez la **blatte**, *Periplaneta americana*, il existe un contrôle de l'enzyme musculaire pendant le vol. L'ADP, le Fru-1,6-P₂ et le citrate n'ont aucun effet tandis que le NH₄⁺, le P_i, l'AMP et le Fru-2,6-P₂, ces deux derniers agissant en synergie, sont activateurs, c'est-à-dire qu'ils augmentent l'affinité de l'enzyme pour le Fru-6-P et diminuent l'inhibition de la liaison enzyme-substrat par de hautes concentrations en ATP. Par ailleurs, une concentration élevée en Fru-2,6-P₂ observée à l'initiation du vol, active la PFK₁ et donc le flux glycolytique [29,30].

Chez le **criquet** pélerin, *Locusta migratoria*, caractérisé par une aptitude au vol prolongé, la diminution de la concentration en Fru-2,6-P₂ aux premiers stades du vol est en partie responsable de la baisse d'activité de la PFK₁ et donc de la conservation des hydrates de carbone. Ce sont les lipides qui servent de source majeure d'énergie. Cela n'exclut pas chez cet insecte orthoptère une augmentation de l'activité phosphofructokinase à n'importe quel stade du vol suite à une demande accrue d'énergie et cela via une élévation de la concentration en AMP et en P_i [31].

Une caractéristique inhabituelle se rencontre dans le muscle de l'**abeille** *Apis mellifica carnica* au cours du vol : la PFK₁ est non seulement inhibée par l'ATP mais également par le Glc-1,6-P₂ et le Fru-1,6-P₂. Cette inhibition par ces deux hexoses bisphosphate n'est pas relevée par l'AMP bien que ce nucléotide soit en grande concentration, mais elle l'est par le Fru-6-P, et plus particulièrement, par le Fru-2,6-P₂ [32].

Dans l'hépatopancréas et le muscle abdominal de l'**écrevisse** *Orconectes limosus*, la PFK₁ se caractérise par une affinité différentielle pour son substrat, le Fru-6-P. Celle-ci est sous la dépendance des

nucléotides adényliques [33].

D'autre part, une étude sur le muscle du **crabe** *Carcinus maenas* n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives avec l'enzyme des tissus mammaliens [34].

Chez les **mollusques** marins, dont la moule, *Mytilus edulis*, et la littorine, *Littorina littorea*, la concentration en Fru-2,6-P₂ en anaérobiose diminue rapidement dans les tissus mous comme le manteau, les branchies et l'hépatopancréas. Sa concentration qui ne représente plus alors que 2,5 à 4 % de la valeur trouvée dans les tissus-contrôle de l'huître, *Ostrea edule*, fait partie du déclin métabolique en anaérobiose et constitue une limite à l'utilisation du carbone glycolytique à d'autres fins que la production d'énergie [35].

2.2 Les isoenzymes.

Différents isoenzymes sont présents dans les tissus animaux. Certains auteurs font état de l'existence de trois isoenzymes de base de la PFK₁ : le type A ou PFK_M qui est le seul isoenzyme de muscle squelettique adulte (PM = 84.000), le type B ou PFK_L trouvé comme l'isoenzyme principal du foie (PM = 80.000) et le type C majoritaire dans le cerveau (PM = 86.000) qui correspond pour certains auteurs à la sous-unité F contenue principalement dans les fibroblastes ou encore à la sous-unité P contenue dans les plaquettes sanguines [36,37,38]. Selon d'autres, la PFK₁ de la muqueuse des cellules épithéliales de l'intestin grêle de rat est distincte de chacun de ces isoenzymes. Ils la désignent comme étant la PFK₁ de type D. L'enzyme natif est un tétramère formé de monomères de PM égal à 84.500 (± 5.000). Cette PFK₁ présente une courbe de saturation pour le Fru-6-P qui est moins sigmoïde que celle des trois autres types. Elle est des quatre types de PFK₁ la moins inhibée par l'ATP et la plus activée par les effecteurs positifs que sont l'AMP, l'ADP, le Glc-1,6-P₂ et le Fru-2,6-P₂. Cela coïncide bien avec le taux élevé de glycolyse observé dans la muqueuse intestinale [39,40,41].

Les isoenzymes résultant de l'assemblage des trois types de sous-unités appelées M, L et F (ou P) forment un système trigénique dans les cellules sanguines humaines. Ils ont tous les mêmes propriétés cinétiques générales. Cependant, ils diffèrent dans leur sensibilité à l'inhibition par l'ATP : l'enzyme de muscle (M₄) est moins sensible à cet effecteur que l'enzyme hépatique (L₄). Ils montrent aussi des différences dans leur sensibilité à d'autres modulateurs et dans leur tendance à former des agrégats de haut

Inhibitors	Activators	Deinhibitors of ATP, citrate, or Mg ²⁺
ATP	NH ₄ ⁺	cAMP
Citrate		AMP
Mg ²⁺	K ⁺	ADP
Ca ²⁺	P _i	Fru 6-P
Phosphocreatine		P _i
Glycerate 3-P	AMP	
Phosphoenolpyruvate	cAMP	Fru-1,6-P ₂
Glycerate 2-P	ADP	Glc-1,6-P ₂
Glycerate-2,3-P ₂	Fru-1,6-P ₂	Man-1,6-P ₂
Oleate or palmitate	Peptide stabilizing factor	
Fructosebiphosphatase		
3',5'-Cyclic GMP		

Fig. 5 : Les effecteurs de la PFK₁ [47].

moléculaire [24].

Dans les **tissus humains**, les propriétés cinétiques et régulatrices de la PFK₁ sont dépendantes de sa composition en sous-unités. En effet, elle est formée non seulement d'une combinaison de deux ou trois isoenzymes tétramériques mais aussi de mixtures complexes d'homo- et d'hétérotétramères [43]. Il est possible de produire des anticorps monoclonaux qui distinguent les isoenzymes présentant des similarités structurales et fonctionnelles. Les immunoréactivités différentielles des PFK₁ suggèrent fortement la présence d'isoenzymes distincts dans toutes les espèces de vertébrés étudiés [36].

Chez le **rat**, on a observé une modification du patron isoenzymatique dans le foie, le coeur et le muscle squelettique en fonction de l'âge de l'individu.

Généralement chez les jeunes rats, chaque organe contient plusieurs isoenzymes alors que, chez les adultes, un seul isoenzyme est conservé. Ces altérations dans l'activité et dans le modèle isozymique de la PFK₁ semblent être dues à l'activité séquentielle de la structure de leurs gènes correspondants [44]. Des changements dans la composition et le nombre d'isoenzymes pourraient être programmés génétiquement ou être le résultat d'influences environnementales telles des modifications nutritionnelles et/ou hormonales. A titre d'exemple, chez le rat, l'apparition de glucokinase hépatique environ seize jours après la naissance est expliquée en partie par la quantité accrue d'hydrates de carbone dans la nourriture. Puisque l'apparition de l'enzyme PFK_M dans les muscles cardiaque et squelettique en développement se réalise au cours de la première semaine, on ne peut l'expliquer par des modifications du régime alimentaire [45].

D'autre part, le patron isoenzymatique de la LDH chez le crabe hyperosmorégulateur, *Eriocheir sinensis* (sujet de notre étude), est modifiée en fonction de la salinité du milieu [46].

2.3 Régulation.

Effecteurs allostériques.

La PFK₁ est soumise à une riche variété de signaux métaboliques qui l'incluent dans une série complexe de mécanismes de régulation. En 1980, on a établi une liste de 23 effecteurs de la PFK₁ à côté de celui qui est le plus puissant, le Fru-2,6-P₂ (fig. 5). Bien que sa régulation puisse être facilement expliquée par l'action d'un nombre très limité de ceux-ci, le contrôle de son activité apparaît être plus complexe [23].

Association-dissociation.

L'état d'aggrégation de la PFK₁ constitue un de ses modes de régulation. L'enzyme s'associant en polymères, présente une activité accrue. Il semble que certains effecteurs allostériques, ainsi que la calmoduline contrôlent la formation de ces complexes [23,48].

Etat d'oxydation des groupements -SH.

Un autre facteur affectant sévèrement l'activité de la PFK₁ est l'état d'oxydation d'un groupement -SH hautement réactif de sa molécule. L'oxydation de ce résidu cystéine qui entraîne l'inactivation de l'enzyme est retardée par la présence d'ATP et d'effecteurs positifs. On a postulé récemment qu'il y aurait un mécanisme général qui contrôlerait l'étage d'oxydoréduction des groupes -SH *in vivo* [23].

Phosphorylation.

Il a été démontré que la PFK₁ de mammifère et celle du parasite *Ascaris suum* peuvent être phosphorylées de manière réversible. Ces mêmes enzymes se trouvent dans un état partiellement phosphorylé *in vivo*. Par référence aux mécanismes bien connus de la régulation d'enzymes via une interconversion nécessitant de l'énergie et spécialement par une phosphorylation réversible, il était évident que la phosphorylation avait une signification fonctionnelle dans le cas de la PFK₁ [23]. Cet aspect est examiné plus amplement ci-dessous.

2.3.1 La phosphorylation.

A. Introduction.

L'implication physiologique des deux principaux types de régulation de la PFK₁ que sont la phosphorylation et le contrôle allostérique est sujette à discussion. La modulation non covalente de l'enzyme par l'ATP et les effecteurs positifs tels que l'AMP est reliée au niveau énergétique intracellulaire. La phosphorylation quant à elle, est vraisemblablement un mécanisme couplé au contrôle hormonal [49]. D'autres considèrent le contrôle allostérique comme rapide et transitoire au contraire de la régulation par phosphorylation des protéines qui est plus lente et plus durable [50]. La multitude de réactions de phosphorylation/déphosphorylation incluses dans les contrôles métaboliques peut, à première vue, paraître déroutante dans sa complexité. Cependant,

deux mécanismes importants ont émergé ces dernières années :

a) Les enzymes inclus dans les voies de biodégradation sont habituellement activés par phosphorylation et inactivés par déphosphorylation tandis que plusieurs enzymes inclus dans les processus biosynthétiques sont inactivés par phosphorylation et réactivés par déphosphorylation.

b) La plupart des réactions de phosphorylation / déphosphorylation sont catalysées par quelques protéines kinases et protéines phosphatases ayant donc des actions pléiotropiques [51].

La nomenclature suivante a été adoptée pour les protéines kinases :

Il y a celles qui phosphorylent les résidus sérine ou thréonine. Parmi celles-ci, les protéines kinases dépendant soit du AMPc (protéines kinases A), soit du GMPc (protéines kinases G) ou encore du Ca^{2+} dont les protéines kinases C .

Moins nombreuses sont celles qui phosphorylent les résidus tyrosine, notamment la tyrosine kinase du facteur de croissance épidermique (EGF) et du récepteur insulinique [52].

B. Kinases susceptibles de phosphoryler la PFK₁.

Des études ont été réalisées sur la capacité qu'ont les enzymes glycolytiques et gluconéogéniques d'être phosphorylés. Ainsi, il a été démontré que, parmi les enzymes catabolisant le glucose, la PFK₁ musculaire de lapin , outre le fait qu'elle soit avec la PGM le meilleur substrat pour les protéines kinases du récepteur insulinique, l'est également pour la protéine kinase A [23,53].

Les protéines kinases dépendantes de l'AMPc.

La PFK₁ provenant de différents organes (muscles squelettique et cardiaque, foie, rein, erythrocyte) de nombreuses espèces de vertébrés peut être phosphorylée par les protéines kinases A. Ces modifications covalentes sont sensibles à quelques régulateurs allostériques. Parmi eux, l'AMP mM augmente le taux de phosphorylation de l'enzyme du muscle squelettique de lapin de 34 %; le Fru-1,6-P₂ , 1mM de 91 %; quant au citrate 2 mM, il la réduit de 65 % [23]. Généralement, la stœchiométrie de la phosphorylation est de loin inférieure à la valeur attendue de quatre moles de PO_4^{3-} / mole de tétramère de PFK₁.

Pour la PFK₁ du foie de rat, la valeur maximale est de deux moles de PO_4^{3-}

/ mole de tétramère. Cette incorporation est insensible aux ligands allostériques (Fru-1,6-P₂ ou PO₄³⁻).

Deux hypothèses sont proposées pour essayer d'expliquer cette stoechiométrie réduite :

* Soit le tétramère est formé par deux types de sous-unités (une structure du genre α_2/β_2) et il n'y a qu'un type qui soit phosphorylable. Si c'est le cas, ces deux sous-unités sont très similaires car elles n'ont pu être séparées par électrophorèse à deux dimensions.

* Soit la PFK₁ ne subirait réellement la phosphorylation que de la moitié de ses sites. Cela pourrait s'expliquer de la manière suivante : un premier protomère phosphorylé interagirait immédiatement avec un second non phosphorylé et inhiberait la phosphorylation de ce dernier. Deux de ces dimères mixtes s'associeraient pour former le tétramère, ce dernier incluant un maximum de deux PO₄³⁻ [54].

Les protéines kinases dépendantes du Ca²⁺

La protéine kinase dépendante du Ca²⁺ / phospholipides (protéine kinase C), isolée à partir du cerveau de rat, phosphoryle la PFK₁ musculaire du lapin. Cette réaction se produit sur plusieurs sites dont un commun à la protéine kinase A [55]. La PFK₁ du foie de rat peut aussi être phosphorylée par la protéine kinase qui dépend du Ca²⁺ / calmoduline. La stœchiométrie de la réaction est proche de celle produite par la protéine kinase A (deux moles de PO₄³⁻ / mole de tétramère); de même, les sites de fixation du PO₄³⁻ sont identiques à ceux identifiés pour les protéines kinases A [56].

La tyrosine kinase

La PFK₁ du muscle squelettique de lapin peut être phosphorylée *in vitro* par la tyrosine kinase du récepteur insulínique et du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF). Cette modification covalente se produit sur des résidus tyrosine de l'enzyme. On ne sait pas si cette réaction se produit *in vivo* et ce qu'il en résulte du point de vue de la régulation de la glycolyse. La stœchiométrie est de 0,01 mole de PO₄³⁻ / mole de tétramère. Cette valeur est identique à celle rapportée pour les autres substrats des tyrosines kinases [53].

C. Signification de la phosphorylation de la PFK₁ - Influences éventuelles sur les propriétés cinétiques.

Généralités.

Durant les dix dernières années, on a démontré qu'un grand nombre d'enzymes et de protéines sont modifiés *in vitro* et *in vivo* par la phosphorylation réversible.

Dans beaucoup de cas, cette modification covalente altère les propriétés fonctionnelles des protéines. Prenons comme exemple, le rôle du groupe PO_4^{3-} sur l'activité de l'enzyme contrôlant la dégradation du glycogène : la phosphorylase. Celle-ci existe sous deux formes interconvertibles : la forme b déphosphorylée, inactive et la forme a phosphorylée, active. Une théorie moléculaire explicative a été proposée : le peptide NH_2 -terminal de la phosphorylase b qui possède le site de phosphorylation, est faiblement lié à la surface de l'enzyme. La transformation de la forme b en a par fixation d'un PO_4^{3-} sur un groupe sérine, engendre un changement de conformation produit par une interaction ionique plus forte entre les sous-unités.

Quant à la PFK₁, il est probable qu'une telle interaction s'effectue entre le résidu PO_4^{3-} situé sur le peptide carboxy-terminal, le peptide lui-même et d'autres groupes spécifiques de la sous-unité. La phosphorylation produirait donc des modifications conformationnelles rendant l'enzyme plus ou moins sensible à différents effecteurs. Toutefois, le mécanisme par lequel ces changements s'accomplissent n'est pas encore entièrement élucidé [23,57].

Les PFK₁ mammaliennes.

Les enzymes hépatique et musculaire .

De manière générale, la phosphorylation de la PFK₁ de foie par les protéines kinases A induit dans les conditions physiologiques une baisse de l'activité de l'enzyme. Par contre, la diminution de l'activité de la phosphofructokinase n'est pas évidente dans le muscle. Ceci peut se comprendre car, puisqu'il s'agit d'isoenzymes différents, il n'est pas nécessaire d'attribuer des conséquences analogues à la même modification covalente [23].

* Des cinétiques allostériques et des études de liaison de ligands ont montré que la phosphorylation des enzymes de foie et de muscle par les protéines kinases A affecte principalement la liaison de l'ATP au site inhibiteur. D'une part, la fixation du PO_4^{3-} produit une sensibilité accrue à

l'inhibition par l'ATP et, d'autre part, une liaison plus forte de celui-ci à son site inhibiteur. Ceci est sensible au pH : il existe peu de différences entre la forme phosphorylée et déphosphorylée à pH 8,0; par contre, à pH acide, la liaison de ce nucléotide inhibiteur à l'enzyme phosphorylé est plus forte. Notons aussi que la PFK₁ musculaire sous forme phosphorylée est moins sensible à l'activation par le PO_4^{3-} , l'AMP et le Fru-2,6-P₂. Un modèle théorique a été proposé pour décrire le comportement cinétique de l'enzyme. Selon lui, la PFK₁ existe sous deux conformations différant l'une de l'autre par la protonation ou la non-protonation d'un résidu spécifique. Ces deux formes, en équilibre, fixent différemment les ligands : l'ATP se lierait préférentiellement à la forme protonée; le Fru-6-P et les autres activateurs, à la forme non protonée. La phosphorylation déplacerait cet équilibre vers la forme protonée. Cette modification covalente serait l'équivalent d'un effecteur intracellulaire non diffusible [57].

* Nous avons relaté précédemment que l'enzyme musculaire de lapin est phosphorylable par la protéine kinase C. Ceci affecte ses propriétés allostériques : la courbe de saturation pour le Fru-6-P est moins sigmoïdale et le V_{max} est légèrement supérieure. Dans des conditions physiologiques, cette phosphorylation correspond à une activation de l'enzyme. Ce mode de régulation de la PFK₁, et donc de la glycolyse, prend toute son importance lorsqu'on sait que la contraction musculaire inclut l'action de protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} et que l'affinité de celles-ci pour l'enzyme est plus forte que celle des protéines kinases A [23,55].

*Des résultats récents et préliminaires obtenus avec la tyrosine kinase du récepteur insulinique suggèrent que la phosphorylation de la PFK₁ musculaire produit des modifications de son état d'aggrégation et donc de son activité [53]. Dans le même ordre d'idée, une hypothèse générale a été proposée selon laquelle la modification covalente de l'enzyme-clé de la glycolyse affecterait le flux catabolique du glucose par réarrangement spatial des enzymes de la voie d'Embden-Meyerhof. L'organisation supramoléculaire de ceux-ci pourrait faciliter le transfert du produit d'une réaction à l'enzyme suivant et empêcher la dilution des métabolites dans l'espace cellulaire. Toutefois, bien qu'il existe des arguments en sa faveur, l'influence de la phosphorylation de la PFK₁ sur sa tendance à interagir avec d'autres molécules et avec le "squelette intracellulaire" demeure encore au stade d'hypothèse.

Puisque des interactions entre la PFK₁ et d'autres métabolites en changent les propriétés cinétiques, une influence de la phosphorylation sur celles-ci fournirait un mécanisme nouveau et élégant de la régulation métabolique. Il ressort de ce qui précède que le fait de ne pas détecter des changements

cinétiques nets suite à la phosphorylation *in vitro* des PFK₁ mammaliennes de muscle et de foie (surtout par les protéines kinases A), ne doit certainement pas écarter l'idée d'un tel mode de contrôle. S'il n'existe pas encore de théorie solide quant à la raison d'être physiologique de cette modification covalente, la phosphorylation apparaît dans tout le règne animal comme un des mécanismes les plus communs pour la régulation des fonctions protéiniques [23].

Les enzymes d'autres tissus .

*La PFK₁ des tissus adipeux blanc et brun provenant de l'épididyme de rat peut être phosphorylée par la sous-unité catalytique des protéines kinases cAMP-dépendantes. Contrairement à ce qui a été observé dans le muscle et le foie, la phosphorylation induit cette fois une nette activation de l'enzyme. Celle-ci résulte d'une diminution de l'inhibition par l'ATP et, dans le cas du tissu adipeux blanc, d'une sensibilité plus grande au Fru-2,6-P₂. Par conséquent, une concentration cytoplasmique accrue en AMPc en réponse à un message hormonal, se traduit ici par une activation de la voie glycolytique due à l'action des protéines kinases A [58].

* La phosphorylation d'enzymes solubles par des protéines kinases a été démontrée dans les érythrocytes humains. Toutefois, aucun effet régulateur sur la PFK₁ n'a été détecté : aucune différence cinétique n'a été observée, pas plus que des différences entre formes phosphorylées et déphosphorylées [59].

Les PFK₁ d'invertébrés.

Chez l'*Ascaris suum* et *Dilofilaria immitis*.

La phosphorylation de la PFK₁ musculaire de ces nématodes est catalysée par les protéines kinases A purifiées à partir du coeur de bœuf. La stœchiométrie de la réaction est de une mole de PO₄³⁻ / mole de sous-unité pour l'*Ascaris* et de 0,8 pour *Dilofilaria*. A pH 6,8 et pour des concentrations inhibitrices en ATP, l'activité catalytique de l'enzyme est augmentée d'un facteur trois ou quatre. Chez ces animaux, la phosphorylation de la PFK₁ est considérée comme un des modes de régulation prépondérant du métabolisme énergétique des hydrates de carbone [60,61].

Chez le buccin, *Busycotypus canaliculatum*.

La régulation de la PFK₁ du muscle du pied a été étudiée chez ce mollusque marin. L'enzyme présente des cinétiques différentes en aérobiose et en anaérobiose. Notamment, dans cette dernière condition, une plus forte inhibition par l'ATP et une sensibilité moindre aux activateurs. Ces différences rappellent celles rapportées pour les formes phosphorylées et déphosphorylées de la PFK₁ d'autres animaux. En outre, le traitement de la PFK₁ musculaire par une phosphatase alcaline produit, en anaérobiose, une diminution de sa constante d'affinité pour le Fru-2,6-P₂. En conséquence, le stress physiologique de l'anoxie se traduirait chez le buccin par une modification covalente de l'enzyme conduisant à une diminution de son activité. L'incubation de l'enzyme avec des protéines kinases A mammaliennes n'a pourtant pas produit le résultat escompté. Des études ayant trait à la phosphorylation de la pyruvate kinase suggèrent, à ce propos que la PFK₁ mammalienne n'est pas compatible avec les enzymes du mollusque dans le sens où les protéines kinases A de mammifères semblent fixer le PO₄³⁻ sur un groupement sérine alors que celles du mollusque le ferait plutôt sur un résidu thréonine [62].

Chez la douve *Fasciola hepatica*.

La sous-unité catalytique de la protéine kinase A phosphoryle la PFK₁ de *Fasciola hepatica*. L'incorporation maximale correspond à 0,3 mole de PO₄³⁻ / mole de protomère. Ses propriétés cinétiques sont altérées et, comparativement à l'enzyme natif, l'enzyme phosphorylé a une plus grande affinité pour son substrat, le Fru-6-P (Km sept fois supérieur) et une sensibilité plus faible à l'inhibition par l'ATP (10,5 huit fois supérieur). Ces changements cinétiques sont similaires à ceux observés sur l'enzyme natif en présence d'effecteurs positifs tels que l'AMP et le Fru-2,6-P₂. En outre, ces deux derniers activent l'enzyme phosphorylé en augmentant encore l'affinité de l'enzyme pour le Fru-6-P et en diminuant sa sensibilité à l'inhibition par l'ATP. La PFK₁ de la douve hépatique peut donc être modulée aussi bien par phosphorylation que par liaison non covalente de différents ligands [25,49].

En conclusion, il semble que, contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, la phosphorylation de la PFK₁ d'invertébrés induit des modifications nettes de leurs propriétés cinétiques.

D. Rôle de la phosphorylation dans le contrôle hormonal de l'activité de la PFK₁.

Le but de ce paragraphe est de fournir des éléments de compréhension sur la contribution de la phosphorylation de la PFK₁ dans le contrôle hormonal de la glycolyse.

Préliminaires.

Les hormones sont des signaux extracellulaires qui se trouvent dans le sang à des concentrations nanomolaires ou subnanomolaires. Ils peuvent induire en quelques secondes des changements drastiques de la concentration de certains métabolites; soit une amplification du signal d'au moins un million de fois suite à leur interaction avec les récepteurs membranaires. En outre, les actions hormonales sont presque toutes pléiotropiques et capables de produire des réponses diverses selon le type cellulaire. L'amplification et la diversité de leurs effets résultent de deux mécanismes principaux : la phosphorylation réversible des protéines et la formation de molécules particulières appelées seconds messagers.

Comme souligné auparavant, beaucoup de protéines-clés régulatrices existent sous deux formes, phosphorylées et déphosphorylées; leur niveau de phosphorylation reflétant l'action combinée de protéines kinases et de phosphatases. La phosphorylation de résidus sérine, thréonine ou accessoirement tyrosine engendre des modifications conformationnelles de ces protéines, altérant plus ou moins leurs propriétés biologiques.

Les seconds messagers régulent quant à eux l'activité des protéines kinases et phosphatases, ce qui amène une modification de l'état de phosphorylation de beaucoup de protéines intracellulaires.

Ce processus d'amplification déclenché par les stimuli hormonaux se situe au niveau des protéines régulatrices que sont les enzymes. Par ailleurs, il ne faut pas perdre de vue que la phosphorylation touche aussi des protéines qui ne sont pas des enzymes avec les modifications que cela engendre. Ceci démontre que la phosphorylation / déphosphorylation est un mécanisme majeur dans la traduction de stimuli hormonaux et autres signaux extracellulaires [51].

Ainsi l'inhibition de la glycolyse par le glucagon dans le foie de mammifère en est un bel exemple. L'action de cette hormone s'explique par la séquence d'évènements suivants :

la stimulation des protéines kinases, l'inactivation de la PFK₂ (l'enzyme qui forme le Fru-2,6-P₂ à partir du Fru-6-P et d'ATP) et l'activation

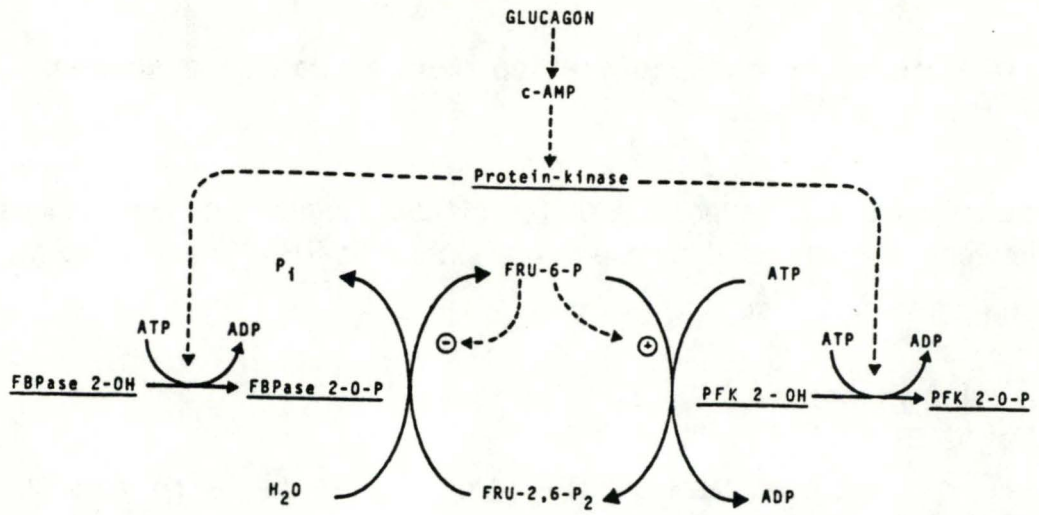


Fig. 6 : Biosynthèse et biodégradation du Fru-2,6-P₂ dans le foie et leur contrôle par le glucagon [24].

concomitante de la FBPase₂ par phosphorylation : la biosynthèse de cet hexose bisphosphate s'arrête alors que sa biodégradation s'accroît. Dès lors, celui-ci ne peut plus stimuler la PFK₁, ce qui se traduit par une diminution du catabolisme des glucides via la voie d'Embden-Meyerhof (fig. 6) [24].

Effets de l'insuline et du glucagon.

Dans le muscle.

Dans le muscle squelettique, l'action de l'insuline se traduit par une réduction de l'activité de la protéine kinase A. Chez les souris diabétiques (absence d'effet de l'insuline), on constate une augmentation de la phosphorylation de la PFK₁. Cependant, les formes phosphorylées et déphosphorylées ne montrent que de petites différences dans leurs cinétiques allostériques. Néanmoins, chez ces souris, l'activité spécifique de l'enzyme ne représente que 70 % de celle des souris normales. L'augmentation de la phosphorylation ne peut donc expliquer une activité glycolytique réduite [23].

Dans le muscle cardiaque de rat, le taux glycolytique augmente de cinq fois en présence d'insuline. On retrouve le même effet lorsque le travail cardiaque augmente. Dans ce cas, le stimulus sous-jacent ne serait pas la phosphorylation d'enzymes mais plutôt la présence d'un activateur, le Fru-2,6-P₂ [63].

Dans le tissu adipeux.

Dans l'épididyme de rat, l'action de l'insuline sur le tissu adipeux blanc se traduit par une phosphorylation plus intense (doublée) de la PFK₁ [64].

Dans le foie.

Dans le foie, l'insuline n'entraîne pas de modification significative de la phosphorylation de la PFK₁ [23]. Par contre, elle semble affecter le "turn-over" de l'enzyme. Une étude portant sur des rats diabétiques a montré en effet que l'activité ainsi que l'immunoréactivité de la PFK_{L2}, principal isoenzyme du foie, diminuent chez les rats diabétiques mais retrouvent une valeur parfois supérieure à la normale suite au traitement à l'insuline. Cette diminution est le résultat d'un taux de dégradation accru de l'enzyme, la vitesse de synthèse restant normale. Le traitement insulinique double celle-ci et diminue sa vitesse de dégradation. L'isoenzyme minoritaire (la PFK_{L1}), quant à lui, est peu sensible à l'insuline. La découverte récente d'un

facteur stabilisant la PFK_{L2} suggère que l'insuline module le degré de dégradation de l'enzyme en contrôlant la quantité de ce facteur. Elle est en effet inversement proportionnelle au degré de dégradation de la PFK_{L2} [65,66].

L'explication de l'action du glucagon par phosphorylation de la PFK_1 fut l'objet d'une controverse. Certains auteurs postulaient que la paire enzymatique PFK_1 - $FBPase_1$ est un des sites d'action de cette hormone pour la régulation de la gluconéogenèse hépatique. Ils avançaient l'hypothèse d'une modification covalente de la PFK_1 et non d'un changement dans la concentration de certains effecteurs. Selon eux, ce phénomène était vraisemblablement modulé par le AMPc. Quatre faits appuient cette proposition :

- * Le AMPc ajouté à des hépatocytes isolés inactive également l'enzyme.

- * L'inactivation de la PFK_1 est concomitante à celle de la PK et à l'activation de la phosphorylase du glycogène (deux enzymes phosphorylés par la protéine kinase A).

- * L'inhibition de la PFK_1 par le glucagon est réversible et ceci peut être accéléré en présence d'insuline.

- * Les doses de glucagon nécessaires à l'inactivation de la PFK_1 et celle de la PK sont similaires [67].

D'autres auteurs ont réfuté cette hypothèse. Tout d'abord à partir du fait que l'insuline n'affecte pas la phosphorylation de l'enzyme hépatique et que pourtant elle le réactive après l'action du glucagon. Il faut donc envisager d'autres mécanismes que la modification covalente de la PFK_1 pour expliquer cette variation d'activité. D'autre part, si on filtre un extrait de foie sur tamis moléculaire (Sephadex G 25), la préparation dépourvue de composés de petits PM, notamment du Fru-2,6- P_2 , présente les mêmes caractéristiques que celles obtenues à partir d'hépatocytes traités au glucagon [24].

Effet d'autres hormones.

Dans le muscle .

Dans le muscle squelettique mammalien, des stimulateurs

adrénergiques comme l'isoprotérénol, provoquent l'augmentation transitoire du degré de phosphorylation de la PFK₁ [23]. Les substances "hormones-like" telles que l'acétylcholine et la sérotonine (5-hydroxytryptamine), stimulent la phosphorylation de la PFK₁ du muscle d'*Ascaris suum* [23]. La deuxième n'a toutefois pas d'effet direct sur l'activité de la PFK₁ d'*Hymenolepis diminuta* mais elle peut provoquer l'augmentation de la glycolyse. En effet, en présence de GTP, elle élève soit la concentration de AMPc soit celle d'AMP en doublant l'activité de l'adénylate cyclase. Ces nucléotides peuvent, eux, augmenter l'activité phosphofructokinase. Néanmoins, ces expériences ne nous permettent pas de dire s'il s'agit d'une régulation allostérique ou d'une régulation par phosphorylation [68].

Dans le tissu adipeux .

Des agents β -adrénergiques augmentent la phosphorylation de l'enzyme des tissus adipeux blancs provenant de l'épididyme de rat. L'exposition du tissu à l'adrénaline, à l'isoprénaline (β -agoniste) augmente de cinq fois la phosphorylation. Aucun changement n'est détecté avec la phényléphrine (α -agoniste) [64].

Dans le foie .

L'adrénaline n'a aucune influence significative sur la phosphorylation de la PFK₁ de foie [23].

Remarque : Effet de certains métabolites sur la phosphorylation de la PFK₁.

La phosphorylation de la PFK₁ de foie semble augmenter en présence de glucose. De hautes concentrations en L-alanine ainsi qu'en lactate abolissent cet effet dans les hépatocytes [23].

Dans les érythrocytes .

L'effet de stéroïdes d'origine surrénale a été démontré sur la PFK₁ d'érythrocytes humains. Leur incubation avec du cortisol entraîne une altération des propriétés régulatrices de la PFK₁. Elle devient moins sensible à l'inhibition par l'ATP et le citrate. Cet effet est aboli par l'alanine. Des modifications régulatrices similaires ont été observées avec l'aldostérone et la corticostérone. Le mode d'action de ces stéroïdes via la synthèse protéique ne peut être envisagée étant donné que les globules

rouges mûres ne synthétisent pas de protéines. On a proposé comme mécanisme la liaison du stéroïde à l'enzyme induisant un effet allostérique. Ceci a été observé pour un autre enzyme : la nucléoside-nucléotide phosphotransférase C. Puisque 87 % du cortisol se trouve sous forme libre dans l'érythrocyte, sa liaison à l'enzyme paraît plausible. Une autre possibilité est l'induction de la phosphorylation érythrocytaire par les stéroïdes. Toutefois, aucun élément n'appuie l'hypothèse d'un tel mécanisme [69].

Chapitre 3 : La régulation ionique et osmotique : rôle de la branchie.

3.1 Osmolalité chez les crustacés .

3.1.1 Introduction .

Dans le but d'étudier les conséquences métaboliques, particulièrement dans l'utilisation des hydrates de carbone, inhérentes aux mécanismes respiratoire et osmorégulateur, il convient de décrire brièvement ceux-ci chez les crustacés.

A. La respiration.

Si on fait une brève étude phylogénétique de la respiration chez les crustacés, on remarque que ce mécanisme s'est fort diversifié. Les formes primitives développent les unes une respiration tégumentaire, et d'autres une respiration par prise orale et anale d'eau . Le tube digestif y est donc utilisé comme soutien principal de la respiration. Par contre, chez les crustacés, tels que les crabes, la respiration est assurée par des structures spécialisées, les branchies, aidées en cela par une respiration tégumentaire plus ou moins importante suivant les espèces [16].

B. La régulation osmotique et ionique.

L'observation du monde marin et plus particulièrement, celui des crustacés, nous montre qu'il y a deux types d'individus séparés par une frontière qu'il est impossible de définir : les animaux ne tolérant que de petites variations de salinité du milieu ou les "sténohalins", et ceux qui supportent de larges variations de salinité externe ou les "euryhalins". *Eriocheir sinensis*, sur lequel porte notre étude, fait partie de ce dernier

groupe . Nous porterons donc une attention particulière aux mécanismes d'osmorégulation propres aux euryhalins .

La relation entre osmolarité externe et interne est exprimée en terme d'osmoconformité et d'osmorégulation . Les osmoconformes minimisent les pertes d'eau et d'ions soit en réduisant les gradients qui engendrent les flux de diffusion, soit en diminuant la surface ou la perméabilité des zones d'échanges . Finalement, leur concentration osmotique interne suit celle du milieu externe dans les limites de tolérance .

De manière opposée, les osmorégulateurs ont mis au point des mécanismes compensatoires qui produisent des contre-mouvements de soluté égaux aux gains et aux pertes par diffusion. Dès lors, leur concentration osmotique interne est plus ou moins constante, celle du milieu environnant pouvant être plus basse ou au contraire plus élevée .

Parmi les osmorégulateurs, on définit deux groupes :

les hyperosmorégulateurs (*Eriocheir sinensis* , *Carcinus maenas*) sont des animaux qui, vivant en eau douce ou en eau de mer diluée, doivent faire face à un problème de gain d'eau et de perte d'ions .

L'autre groupe est celui des hypoosmorégulateurs, comme le *Pachygrapsus crassipes*, qui maintiennent leur hémolymphe à une concentration inférieure à celle de l'eau salée environnante. Ils doivent donc résoudre les problèmes posés par une perte d'eau et un gain d'ions.

Tous les epitheliums sont le siège de mouvements d'ions mais certains le sont plus particulièrement et de manière plus importante vis à vis de l'hémolymphe; ce sont les cellules épithéliales du tégument, de l'intestin, des organes excréteurs (glandes antennaires) et des branchies. Jusqu'à présent, on dispose de peu de données sur la part jouée par les deux premiers. S'il est actuellement bien établi que l'organe excréteur agit sur la régulation du volume de liquide interne et sur la réabsorption compensatoire de NaCl chez plusieurs hyperrégulateurs, sa contribution dans la balance ionique est minime si pas nulle. Les branchies, par contre, jouent un rôle primordial dans l'osmorégulation [16,70].

3.1.2 Organes inclus dans l'osmorégulation.

Les branchies, dont nous détaillerons le rôle ultérieurement, sont aidées dans l'osmorégulation par d'autres organes dont font partie le tube digestif et les glandes antennaires .

A. Le tube digestif.

La structure de base du tube digestif est celle d'un cordon de cellules

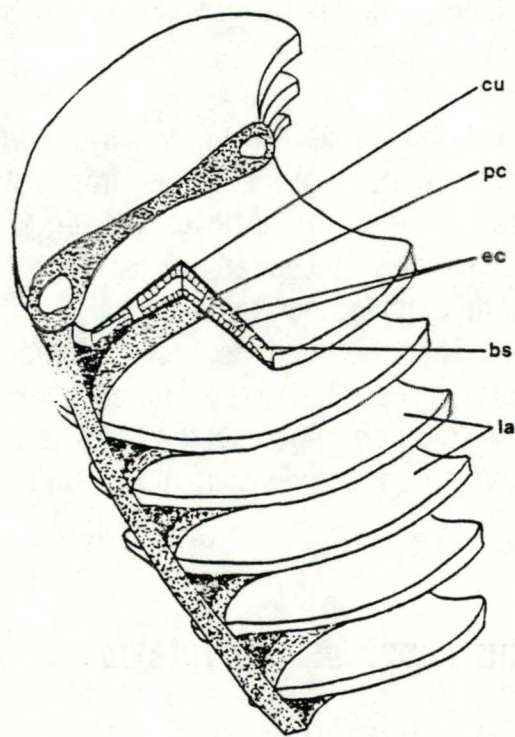


Fig. 7 : Représentation schématique de la branchie de *Callinectes sapidus*.

cu : cuticule
pc : cellule pillier
ec : cellule épithéliale
bs : espace sanguin
la : lamelle branchiale

épithéliales à régions spécialisées. Ainsi, certaines ont essentiellement un rôle nutritif, à savoir l'absorption et le stockage de nutriments ainsi que la sécrétion d'enzymes protéolytiques. De plus, tout au long de ce tube digestif, on retrouve des cellules caractéristiques d'un épithélium transporteur. Ainsi, chez beaucoup d'espèces hypo- ou hyperrégulatrices, le tube digestif est le site d'absorption anale et orale d'eau et d'ions. Finalement, les découvertes d'un potentiel transmembranaire et d'une importante activité ATPasique inhérente aux pompes ioniques, notamment chez *Carcinus maenas*, ont consolidé cette hypothèse de centre iono- et osmorégulateur, actuellement admise par tous [16].

B. Les glandes antennaires.

Les glandes antennaires, ou organes rénaux, jouent également un rôle dans l'osmorégulation. De manière générale, les mouvements ioniques sont localisés dans l'épithélium du sac terminal (ou vessie) dont l'ultrastructure est caractéristique d'un tissu transporteur. Outre les mécanismes d'ultrafiltration de l'urine, on observe chez les hyperrégulateurs d'eau douce une réabsorption compensatoire en NaCl. Cet organe peut aussi réabsorber du glucose et des acides aminés, qui sont des composés osmotiquement actifs très importants dans la régulation du volume tissulaire [16,71].

3.1.3 La branchie comme un organe osmorégulateur.

A. Aspects structuraux.

Les branchies des crustacés jouent un rôle majeur dans les mécanismes de respiration mais aussi de régulation osmotique et ionique. Leur nombre, variable suivant les espèces, est de 12 chez *Eriocheir sinensis*. Chacune est composée d'un rachis médian portant latéralement deux rangées de nombreux saccules lamellaires empilés dans lesquels circule l'hémolymphe (fig. 7). Le tégument branchial est constitué d'un épithélium situé juste en dessous de la cuticule. On y trouve aussi d'autres cellules telles des cellules piliers, des néphrocytes (c'est-à-dire des cellules phagocytaires fixées) et des axones.

Depuis 1934, date des premières expériences de Koch, la coloration à l'argent a été utilisée pour identifier les régions de la cuticule d'arthropodes perméables à l'ion Cl^- et donc, vraisemblablement incluses dans les mouvements d'ions. Cette technique fut employée sur diverses espèces de crustacés et mena à l'identification de l'épithélium de branchie comme le site principal de la régulation ionique du milieu interne du crustacé. Chez le crabe chinois, *Eriocheir sinensis*, on a montré que seules les trois

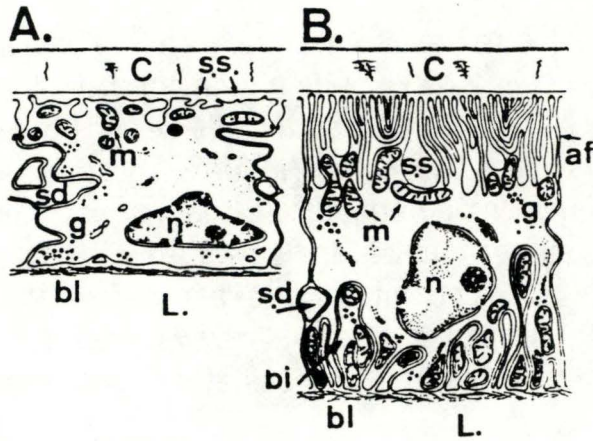


Fig. 2 : Diagrammatic drawings of cross sections of anterior (A) and posterior (B) gills lamellae of *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater. Apical folds (a.f); basal infoldings (b.i); basal lamina (b.l); cuticle (c); glycogene (g); haemolymph (L); mitochondria (m); nucleus (n); septate desmosomes (s.d); sub-cuticular space (s.s.) (After Barra, unpublished; see acknowledgments).

Fig. 8 : Représentation schématique de coupes transversales de lamelles branchiales

antérieure (A) et postérieure (B) d'*Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce [70].

paires de branchies postérieures donnent une coloration positive à l'argent. De tels résultats démontrèrent les différences structurales entre les branchies antérieures et postérieures, reliées peut être à des différences fonctionnelles.

Récemment, des études en microscopie électronique ont confirmé cette hypothèse dans le cas d'*Eriocheir sinensis*. Chez cette espèce, d'importantes différences dans l'ultrastructure ont été trouvées entre les deux types de branchies (fig. 8) : l'épithélium des feuillets branchiaux postérieurs est plus épais (supérieur à 10 μm) que celui des branchies antérieures (seulement 2 à 4 μm) et sa cuticule tend à être plus fine (0,3 μm dans les branchies postérieures contre 1 μm dans les branchies antérieures). Dans les antérieures, les noyaux des cellules épithéliales fines débordent généralement dans l'espace occupé par l'hémolymphe. Le côté apical des cellules juste sous la cuticule est très légèrement plissé, ce qui laisse un compartiment extracellulaire sous la cuticule extrêmement réduit. La quantité d'organelles intracellulaires est très limitée et la membrane plasmique ne montre pas d'importants replis baso-latéraux. Ce type d'épithélium exerce essentiellement une fonction respiratoire.

Chez les crabes acclimatés aux milieux dilués, les branchies postérieures sont caractérisées par un réseau bien développé de larges replis apicaux qui produisent sous la cuticule un vaste compartiment extracellulaire. De profonds replis baso-latéraux entrent en contact étroit avec les membranes de nombreuses mitochondries. Tout ceci confère à ce tissu les caractéristiques d'un épithélium "transporteur d'ions". Le contrôle de l'osmolarité est par conséquent imparti aux trois paires de branchies postérieures chez *Eriocheir sinensis* [16,70].

B. Aspects physiologiques.

Comme les différences ultrastructurales entre branchies postérieures et antérieures le laissent supposer, il existe bien entre elles des différences physiologiques. Prenons par exemple le transport sodique à partir du milieu externe. Il a été établi que le flux de Na^+ dans les branchies antérieures du crabe *Eriocheir sinensis* est essentiellement passif. Néanmoins, cela n'empêche pas l'existence de mécanismes réduisant les pertes associées à ce flux passif. En effet, la perméabilité des branchies antérieures au Na^+ décroît en présence d'une faible concentration de cet ion dans le milieu. Ceci diminue donc la perte de cet ion lors de l'acclimatation d'animaux à de faibles salinités. Par contre, l'entrée de Na^+ du milieu externe à travers l'épithélium des branchies postérieures est le résultat d'un transport actif.

Cet influx de Na^+ est vraisemblablement couplé à l'extrusion de NH_4^+ ou de H^+ .

Des études *in vivo* ont suggéré l'existence de mécanismes indépendants pour l'absorption de Na^+ et de Cl^- dans les milieux dilués [16,70]

C. Osmorégulation et métabolisme énergétique.

Jusqu'à présent, peu de travaux ont été consacrés à l'élucidation des mécanismes biochimiques permettant une activité transportrice et l'osmorégulation chez les crustacés. Trois types de problèmes se présentent:

1) Comment corréler le métabolisme énergétique des branchies et le transport actif ?

2) Quels sont les supports moléculaires de ces transports actifs ?

3) Quels sont les effets des changements de concentration ionique de l'hémolymphe sur les structures protéiques impliquées dans les processus métaboliques intra- et extracellulaires ?

On a tenté de corréler l'adaptation à différents milieux ainsi que les besoins inhérents à la régulation ionique, avec le métabolisme oxydatif et la consommation d'oxygène. A première vue, le taux métabolique accru, se traduisant par une demande énergétique plus élevée, correspondrait à l'activité plus importante des processus de transport. En rapport avec ceci, la quantité d'ATP dans les branchies isolées du crabe bleu *Callinectes sapidus*, aussi bien que son "turn-over" apparaissent être dépendants de la salinité.

L'étude détaillée de la concentration relative des nucléotides puriques chez les deux espèces de crabes euryhalins : *Eriocheir sinensis* et *Carcinus maenas*, a montré que l'augmentation de la demande en énergie qui se manifeste dans des milieux dilués, s'exprime dans le contenu en adénylate des cellules branchiales. Les diminutions observées dans la charge énergétique sont concordantes avec l'idée que l'acclimatation des crabes hyperosmorégulateurs à des milieux dilués mène à une activité transportrice accrue faisant intervenir des pompes. Cette diminution induit à son tour l'élévation du métabolisme oxydatif et de la consommation d'oxygène [70,72].

3.1.4 La branchie comme cible de facteurs hormonaux et des bioamines.

L'activité physiologique et métabolique des invertébrés, comme celle des vertébrés, est soumise au contrôle de plusieurs hormones. Celles-ci sont produites et stockées dans différents organes neuroendocriniennes et

véhiculées par la circulation sanguine. Les facteurs hormonaux et les bioamines agissent à hauteur de nombreux tissus dont vraisemblablement la branchie.

A. Facteurs hormonaux.

Parmi les neurosecrétions produites par les pédoncules oculaires des crustacés, le facteur hyperglycémiant (CHH) agit au niveau des branchies. Ainsi, il stimule la glycogénolyse chez *Uca pugnator* [73]. L'injection de nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) induit le même effet chez d'autres crabes. Dès lors, on peut supposer que ceux-ci sont les intermédiaires intracellulaires de son action [74]. Chez *Orconectes limosus*, le CHH provoque une nette augmentation du taux de AMPc et de GMPc dans certains tissus osmorégulateurs tels les glandes antennaires et le tube digestif. Toutefois, son action éventuelle sur les branchies de cette écrevisse n'a pas été étudiée [75].

Dans un autre centre endocrinien, les ganglions thoraciques, on a découvert une hormone antidiurétique qui diminue la perméabilité à l'eau dans les branchies de crabes hyperrégulateurs acclimatés à l'eau de mer diluée ou à l'eau douce. La perméabilité du tube digestif de *Gecarcinus lateralis* est régulée aussi par des extraits de ces mêmes organes [16]. On retrouve une hormone analogue dans les *corpora cardiaca* (organes neuroendocriniens des insectes) du criquet migrateur. Elle y accroît la réabsorption d'eau à travers la paroi rectale, et cet effet s'accompagne d'une augmentation de la concentration en AMPc dans ce tissu. Il ressort de ce qui précède, que le AMPc est un messager secondaire probable du facteur antidiurétique [76].

B. Bioamines.

Les premiers résultats qui ont appuyés l'hypothèse selon laquelle la branchie est un tissu-cible de composés de ce type, à savoir la sérotonine, la dopamine et l'octopamine, sont la mise en évidence de leurs récepteurs au niveau des branchies d'*Homarus americanus* [77].

Chez les moules d'eau douce *Ligumia subrostrata* et *Carunculina texasensis*, la sérotonine ainsi que la dopamine augmentent la concentration en AMPc dans les branchies. En outre, on y observe un transport ionique et une prise d'eau accrues [78,79]. Le calcium, par contre, diminue l'activité de l'adénylate cyclase [80].

Chez la moule *Mytilus edulis*, la sérotonine peut activer les cils vibratils latéraux des cellules branchiales par phosphorylation, dépendante de AMPc, d'un complexe protéinique régulateur associé à la dynéine (protéine contractile). Le Ca^{2+} , quant à lui, peut inhiber les mouvements ciliaires chez

ce mollusque en se liant à la calmoduline qui est, elle-même, associée à une autre protéine régulatrice [81].

Enfin, chez un crustacé hyperrégulateur, *Callinectes sapidus*, la dopamine et l'octopamine favorisent la prise de Na^+ par la branchie. Le même effet a été observé lorsque cet organe est perfusé avec le dibutyryl-cAMP (analogue de AMPc). Puisque ces deux bioamines extraites de l'organe péricardique augmentent la concentration en AMPc dans les branchies, il est vraisemblable que ces substances soient des facteurs de l'hémolymphe qui favorisent la prise de Na^+ à travers l'épithélium [82].

Ces arguments et d'autres permettent d'affirmer que des hormones et des bioamines modulent la perméabilité des parois cellulaires branchiales et y modifient le taux en AMPc. Par ailleurs, des protéines kinases, molécules ubiquistes, ont été identifiées dans de nombreux tissus de crustacés dont, à titre d'exemple, les protéines kinases A et G dans les branchies du homard [83,84]. De plus, il a été montré que la sérotonine induit la phosphorylation de protéines branchiales via le AMPc, cette action étant modulable par le Ca^{2+} [85].

Dès lors, il nous est permis de supposer que certains signaux hormonaux, voire même des bioamines, puissent agir dans la branchie via le schéma classique de production d'un second messenger (le AMPc). Celui-ci, constituant un intermédiaire à "large spectre", activerait les protéines kinases A avec pour conséquence la phosphorylation de leur substrat protéique dont des protéines membranaires participant aux mécanismes de transports ioniques et peut-être même des protéines solubles dont les enzymes...

Chapitre 4: Objectifs du mémoire .

La première démarche de ce travail consistera à prouver l'existence d'une activité phosphofructokinase dans les branchies antérieures et postérieures du crabe euryhalin *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

Une brève étude cinétique en donnera quelques caractéristiques qui seront comparées à celles de la PFK₁ des vertébrés.

Chez ces derniers, de nombreuses voies métaboliques sont modulées par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation sous contrôle hormonal. De telles réactions quoique moins bien connues, existent également chez les invertébrés, dont les crustacés.

Il est donc intéressant de tester la capacité de l'enzyme branchial à subir des modifications covalentes réversibles suite à l'action de protéines kinases dépendantes du AMPc.

La production d'une sonde immunologique à partir de l'enzyme analogue du muscle squelettique mammalien servira à identifier une PFK₁ phosphorylable dans un pattern de protéines branchiales.

MATERIEL
&
METHODES

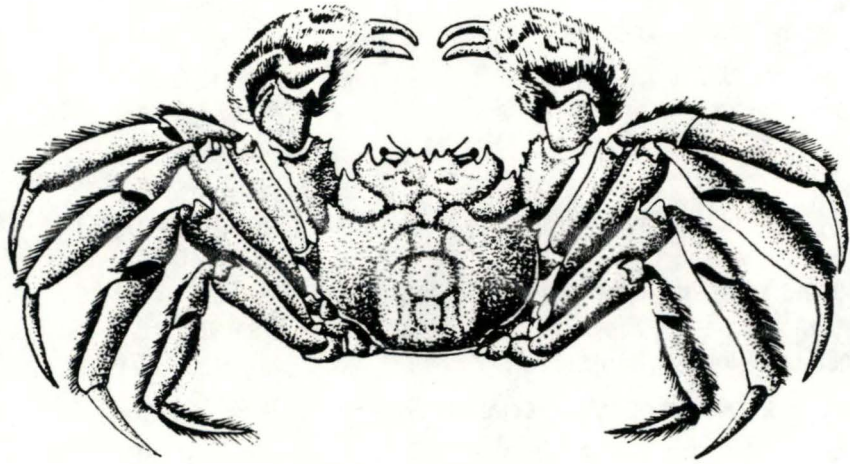
Liste des produits utilisés.

ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzothiazalin-sulfonate])	Boehringer, 756407
Acide acétique glacial	UCB, 1005
Acide citrique	Merck, 244
Acide nitrique	Merck, 455
Acide phosphorique	Merck, 563
Acide trichloracétique	Janssen Chimica, 15.213.81
Adjuvant de Freund complet	(GIBCO)
Adjuvant de Freund incomplet	(GIBCO)
Acrylamide	Bio-Rad, 161-0100
Alcool isoamylique	Merck, 979
Aldolase	Sigma, A-6253
Amidoschwarz	Merck, 1167
AMP (Adénosine-5'-monophosphate)	Sigma, A-1752
AMPc (Adénosine-3',5'-monophosphate)	Sigma, A-6885
Aqualuma plus	Lumac/ 3Mbv, 1067
ATP (Adénosine-5'-triphosphate)	Sigma, A-3377
Bleu Coomassie G-250	Sigma, B-1131
Bleu Coomassie R-250	Merck, 12553
Bleu de bromophénoï	Merck, 8122
Bisacrylamide	Bio-Rad, 161-0200
BSA (albumine sérique bovine)	Sigma, A-4503
AMPc (Adénosine-3',5'-monophosphate)	Sigma, A-6885
Carbonate de sodium	Merck, 6392
C ₄ H ₄ OKNa ₆ .4H ₂ O (tartrate sodico-potassique)	Merck, 8087
CuSO ₄ .5H ₂ O (sulfate de cuivre)	Merck, 2790
DAB (diaminobenzidine)	Sigma, D-5637
DTT (dithiothréitol)	Janssen Chimica, 16.568.78
EGTA (Ethylène glycol-bis-(β-aminoéthyl ether)-N-N,N',N' acide tétraacétique).	Janssen Chimica, 21.550.16
Enlighting	NEN,NEF - 974
Ethanol pur	Merck, 983
Ether diéthylique	Belgolabo
Folin Ciocalteu	UCB, 3283
Formaldéhyde	Vel, 496240
Fru-6-P (fructose-6-phosphate)	Sigma, F-3627
Glycérol	UCB, 1384
Glycérophosphate déshydrogénase	Boehringer, 127.787
Glycine	UCB, 1011
HCl (acide chlorhydrique)	Merck, 317
Histones de type II- A	Sigma, H-9250
H ₂ O ₂ (peroxyde d'hydrogène)	UCB, 1388
Immunoglobulines de lapin anti-rat couplée à la peroxydase	Amersham (N 932)
K ₂ Cr ₂ O ₇ (bichromate de potassium)	Merck, 4859
KCl (chlorure de potassium)	Merck, 4936
KF (fluorure de potassium)	UCB, 1602
Méthanol	Merck, 6009
2-β mercaptoéthanol	Merck, 805740
MgCl ₂ .6H ₂ O (chlorure de magnésium)	Merck, 5833
NaCl (chlorure de sodium)	Merck, 6404
Na ₂ CO ₃ (carbonate de sodium)	Merck, 6392

NADH (nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite)	Sigma, N-8129
NaF (fluorure de sodium)	Merck, 6449
NaHCO ₃ (hydrogénocarbonate de sodium)	UCB, 8547
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (hydrogénophosphate de sodium)	Merck, 6580
NaOH (hydroxyde de sodium)	Merck, 6498
NH ₄ Cl (chlorure d'ammonium)	Merck, 1145
Nitrate d'argent	Merck, 1512
Nitrocellulose	Millipore
[γ - ³² P] ATP ([γ -32 phosphore] adénine-5'-triphosphate)	NEN, NEG - 002H
NP 40	LKB
PBS (phosphate buffer saline)- composition ci-dessous (@).	
Persulfate d'ammonium	Bio-Rad, 161-070
PFK _M (phosphofructokinase du muscle de lapin)	Sigma, E-1752
P _i (sous forme d'hydrogénophosphate de potassium)	UCB, 1628
Protéine kinase A	Sigma, P-5511
SAB(1) (albumine sérique bovine)	Merck, 12018
Saccharose	Tienen-Tirlemont
SDS (sodium dodécyl sulfate)	Merck, 13.760
Séphadex PD - 10	Pharmacia
Sépharose 4B activée au CNBr	Pharmacia
Tampon Hépès (N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-acide éthanesulfonique)	Janssen Chimica, 21.500.63
Tampon imidazole	Merck, 4716
Tampon Pipès (Pipérazine-N-N'-bis[2-acide éthanesulfonique])	Janssen Chimica, 17.261.92
TEMED (N-N'-N'-tétraméthyléthylène diamine)	Bio-Rad, 161-0800
Thalamonal	Janssen Pharmaceutica
Triose phosphate isomérase	Boehringer, 127.787
Tris ([Tris(hydroxyméthyl)aminoéthane])	Janssen Chimica, 16.762.78
Tween 20	Fluka, 93773

(@) composition du PBS

KH ₂ PO ₄ dihydrogénophosphate de potassium	0,2 g (Merck, 4873)
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O hydrogénophosphate de sodium	1,44 g (Merck, 6580)
NaCl chlorure de sodium	8 g (Merck, 6404)
KCl chlorure de potassium	0,2 g (Merck, 4936)
H ₂ O	1000 ml - mettre à pH 7,4



— *Eriocheir sinensis*.

1. Matériel biologique.

1.1 Position systématique.

L'animal sur lequel porte notre étude fait partie de l'embranchement des arthropodes. Le crabe chinois *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards 1854, appartient à la classe des crustacés. Il s'agit plus précisément d'un crustacé décapode brachyoure (croquis ci-contre).

1.2 Stabulation des animaux.

En laboratoire, les animaux sont stockés en eau douce courante, oxygénée et maintenue à une température constante proche de 16°C (± 2).

Trois fois par semaine, ils sont nourris de granules pour truites à base de farine de sang, viande et poissons.

Afin d'éviter toute perturbation métabolique causée par la vitellogenèse et la ponte des oeufs chez la femelle, les individus testés sont exclusivement des mâles.

2. Prélèvement des organes.

Après avoir sacrifié l'animal, nous découpons le bouclier céphalothoracique dorsal. Les branchies, localisées dans les chambres branchiales disposées latéralement, sont découpées, débarassées du rachis calcifié, séchées sur un papier filtre, pesées et découpées en petits morceaux en vue de l'homogénéisation.

3. Préparation des tissus.

3.1. Homogénéisation.

Le broyage des tissus se fait au moyen d'un homogénéiseur de type "Kontes glass CO - Dual[®]21" constitué d'un tube et d'un piston en pyrex. Ce dernier est monté sur une foreuse tournant à 2.800 rpm (position lièvre). L'homogénéisation est réalisée par plusieurs passages au piston pendant deux fois 30 secondes à 10 secondes d'intervalle.

3.2 Milieu d'homogénéisation.

1. Dans tous les cas, à une exception près, les six branchies d'un même type (soit antérieures, soit postérieures) sont homogénéisées dans cinq volumes de tampon glacé Hépès 50 mM à pH 7,4 contenant du KF 100 mM et de l'EGTA 15 mM. L'homogénat est centrifugé à 15.000 X g pendant 30 min. à 4°C. Le surnageant résultant constitue la source de PFK₁.

(e): **Protocole expérimental.**

- Un volume d'échantillon préparé comme mentionné au point 3.2.1 est traité avec quatre volumes de TCA 5 % (P/V).
- La préparation est centrifugée à 10.000 X g pendant 15 minutes à 4°C.
- Après élimination du surnageant, le culot est lavé deux fois avec 4 volumes de TCA respectivement 10 % et 15 %.
- Le culot final est resuspendu dans un volume désiré de tampon de solubilisation si l'échantillon est destiné à l'électrophorèse.
Composition du tampon de solubilisation : voir 6.2 de "Matériel et méthodes".

2. Pour certains tests de phosphorylation, le milieu d'homogénéisation est dépourvu de fluorure et contient du saccharose 0,25 M dans un tampon imidazole 50 mM à pH 7,4. Les branchies d'un même type sont homogénéisées dans neuf volumes de ce milieu.

3.3 Précipitation des protéines au TCA.

L'analyse qualitative des protéines phosphorylables par autoradiographie de gels d'électrophorèse est réalisée sur des échantillons précipités à l'acide trichloracétique. Cette méthode est utilisée pour les deux raisons suivantes : il s'agit d'un moyen simple et rapide pour concentrer les protéines et, dans le cas des réactions de phosphorylation, il permet de se débarrasser du [γ - ^{32}P]-ATP excédentaire qui produirait un bruit de fond masquant totalement l'incorporation du marqueur aux protéines suite à l'action des protéines kinases. Le protocole expérimental est décrit sur la page de gauche (@).

4. Immunisation des rats.

4.1 Les anticorps.

Lorsqu'une substance étrangère ou antigène (Ag) est injectée dans l'organisme d'un vertébré, celui-ci engage une réponse immunitaire contre cet antigène en produisant des anticorps (Ac) qui vont réagir de façon spécifique avec l'Ag qui a induit leur formation.

On appelle immunogénicité la capacité de l'Ag à induire la production d'Ac et antigénicité la capacité de l'Ag à réagir avec l' Ac dirigé contre lui.

Les anticorps sont des sondes hautement spécifiques et leur spécificité est rigoureuse. La taille minimale d'un déterminant antigénique ou épitope (petite partie de l'Ag reconnue par l'Ac) est de 4 à 6 acides aminés. Ils ne reconnaissent pas seulement des épitopes séquentiels, mais également des épitopes conformationnels.

Dans les Ac en tant que réactifs spécifiques, il faut cependant distinguer les Ac polyclonaux et les Ac monoclonaux.

Ac polyclonaux.

Le répertoire inné d'anticorps d'un rat est de plusieurs millions. Près de 1.000 à 8.000 anticorps différents semblent être capables de reconnaître un seul déterminant antigénique. Si on analyse la réponse conventionnelle d'un rat à un Ag, seulement 5 à 10 anticorps différents sont déterminés. Cela représente un échantillon pris au hasard dans le répertoire total. Cet échantillon sera différent chez un autre animal, même si l'Ag est le même.

Ces observations indiquent qu'il est difficile et même impossible de fabriquer un réactif reproductible contre un déterminant antigénique donné. Les désavantages majeurs d'un polysérum sont donc les suivants : les titres sont faibles au contraire des monoclonaux; les Ac, tout en étant spécifiques d'un épitope, sont hétérogènes ; l'approvisionnement est limité à la durée de vie de l'animal ; enfin, la même combinaison d'Ac spécifiques est impossible à reproduire chez un autre animal.

Ac monoclonaux.

Pour pallier les désavantages présentés par le polysérum, Köhler et Milstein (1975) [87] ont fusionné une cellule cancéreuse (myélome) et une cellule lymphocytaire. L'hybridome résultant de la fusion n'est capable de produire qu'un seul type d'anticorps spécifiques d'un et un seul épitope. Cet hybridome a l'avantage de croître indéfiniment.

4.2 Injection des rats.

Lorsque nous avons voulu produire des Ac anti-PFK₁, il n'existait que deux PFK₁ commercialisées (PFK_M et PFK_L, toutes deux provenant des lapins). Nous avons choisi la PFK_M pour des raisons de coût : celle-ci est moins chère car plus facilement purifiable. En effet, le muscle squelettique contient un seul isoenzyme tandis que la PFK_L ne se trouve dans le foie que de façon majoritaire (voir point 2.2 de "Introduction").

Matériel biologique: Huit rats "Wistar" nourris avec des granulés "A04" (U.A.R).

Méthode: Les différentes injections sont sous-cutanées et s'effectuent au niveau du dos de part et d'autre de la colonne vertébrale.

-Immunsation primaire : Un volume de solution antigénique est émulsifié avec un volume d'adjuvant de Freund complet. Trois lots de deux rats mâles sont immunisés : un lot avec 1 mg de PFK_M, le second avec 0,5 mg et le troisième avec 0,25 mg; chaque rat reçoit 0,5 ml de suspension enzymatique.

-Les rappels: Ils sont effectués en remplaçant l'adjuvant de Freund complet par de l'incomplet, au moins trois fois et à trois semaines d'intervalle, chaque rat recevant 1 mg de PFK_M à chaque rappel.

La nomenclature des rats est la suivante :

- * Deux rats auxquels on a injecté 1 mg de PFK_M = rats PFK_M 1mg
- * Deux rats auxquels on a injecté 0,5 mg de PFK_M = rats PFK_M 0,5mg.

(@) : ***Mixture alcaline.***

100 volumes de Na_2CO_3 2 %

1 volume de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 %

1 volume de $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 %

La préparer extemporanément vu l'instabilité de la suspension cuivrrique.

* Deux rats auxquels on a injecté 0,25 mg de PFK_M = rats PFK_M 0,25mg.

D'autre part, nous injectons trois rats femelles avec de la PFK_M électro-éluée (voir point 7.5 de "Matériel et méthodes") : un rat avec 1 mg de protéines, deux autres avec 0,5 mg. La nomenclature de ceux-ci est respectivement de : rat X 1mg et rats X 0,5mg.

On prélève 0,5 ml de sang dans le coeur après avoir anesthésié le rat avec du Thalamonal . Il faut éviter l'éther car il s'est souvent avéré que cet anesthésiant entraînait la mort lors du second prélèvement . Après coagulation, on récupère le sérum qui est alors centrifugé à 5000 X g pendant 5 minutes à 4°C.

5. Dosages

5.1 Définition des unités enzymatiques .

Une unité est définie comme étant la quantité d'enzymes qui tranforme une μ mole de substrat en produit par minute, dans les conditions du dosage.

5.2 Dosage des protéines .

5.2.1 Folin.

Principe.

La méthode utilisée dérive de celle décrite par LOWRY (1951) [88]. Les protéines dénaturées par l'action du NaOH sont mises en présence d'une faible quantité de cuivre (Cu^{++}) en milieu alcalin additionné de tartrate sodicopotassique de manière à le garder en suspension.

De telles conditions permettent la formation d'un complexe Cu^{++} -liaison peptidique.

Lorsqu'on ajoute le réactif de Folin-Ciocalteu, le complexe phosphomolybdique phosphotungstique formé est réduit par les groupements de la tyrosine et du tryptophane (acides aminés aromatiques) de la protéine et une coloration bleue apparaît.

Mode opératoire.

Le dosage se réalise sur 0,5 ml d'échantillon (étalon ou test dilué de façon adéquate). On ajoute à chaque tube 0,5 ml de NaOH 1N. Après trente minutes à température ambiante, on ajoute 5 ml d'une mixture alcaline (@).

Après exactement quinze minutes, on met dans chaque tube 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après trente minutes de réaction, les extinctions sont lues au spectrophotomètre à 660 nm (longueur d'onde à laquelle le colorant présente le maximum d'absorption). L'étalonnage est réalisé à partir de concentrations connues et croissantes en albumine sérique bovine (SAB (1)). La relation entre les extinctions et les concentrations en protéines est linéaire pour des

(Ω) : **Réactif de Bradford "5 X"**

Bleu de Coomassie G-250 0,1 g
Ethanol pur 50 ml

Mélanger environ une heure.

Acide phosphorique 85 % 100 ml

H₂O → volume final = 200 ml - garder à 4°C.

Diluer 5 fois le réactif de Bradford "5 X"

et filtrer sur papier Whatman - conserver à 25°C (environ deux semaines).

(@) : **Composition du milieu réactionnel :**

Tampon Hépès 50 mM pH 7,5

KCl 100 mM

MgCl₂·6H₂O 5 mM

NADH 0,15 mM

P_i 5 mM

AMP 0,1 mM

NH₄Cl 1 mM

0,5 unités d'aldolase et de α-glycérophosphate déshydrogénase

5 unités de triose Phosphate isomérase

Dans un volume final de 1 ml.

quantités comprises entre 0 et 100 µg.

5.2.2 Bradford .

Principe.

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976) en utilisant l'albumine sérique bovine comme étalon [89]. Cette méthode est basée sur l'observation d'un déplacement de la longueur d'onde maximale d'absorption du Bleu de Coomassie G- 250 de 465 à 595 nm lors de la réaction de ce colorant avec les protéines.

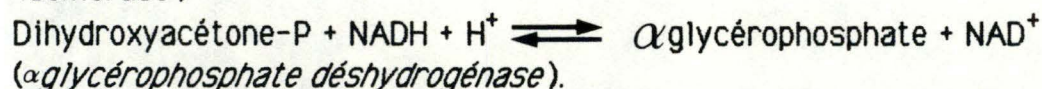
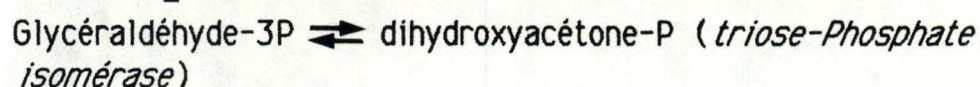
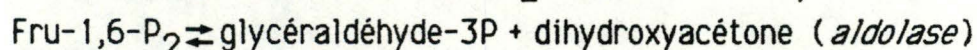
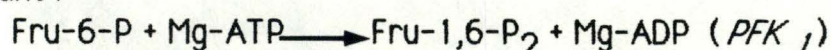
Mode opératoire.

Ajouter 5 ml du réactif de Bradford "1 X" à 0,1 ml de solution de protéines à dilution déterminée(α).

Lire l'absorbance à 595 nm après deux minutes.

5.3 Mesure de l'activité de la PFK₁.

Notre méthode s'inspire de celle de Castaño (1979) [67]. Le principe est le suivant :



L'activité de la PFK est mesurée à 25°C par la diminution d'absorbance à 340 nm résultant de l'oxydation du NADH en NAD⁺. La composition du milieu réactionnel se trouve sur la page de gauche (α).

Les concentrations en Fru-6-P et en Mg-ATP sont respectivement de 5 mM et de 0,5 mM et sont dès lors saturantes. La réaction qui se fait généralement sur 50 µl d'extrait est initiée par l'addition du Fru-6-P.

Tous les enzymes auxiliaires ont été débarassés du sulfate d'ammonium par filtration sur tamis moléculaire Séphadex PD - 10.

A chaque valeur du test est soustraite la valeur du blanc correspondant. Celui-ci est réalisé dans les mêmes conditions hormis l'ajout du Fru-6-P et mesure les différentes interférences dues notamment à d'autres déshydrogénases que celles du test. Les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre (Ultrospec LKB).

Les cinétiques obtenues ont été analysées par la transformation de Lineweaver-Burk et celle de Headie-Hofstee (fig.A et B ci-dessous) [1].

Figure A
Représentation de Lineweaver-Burk (en double inverse).

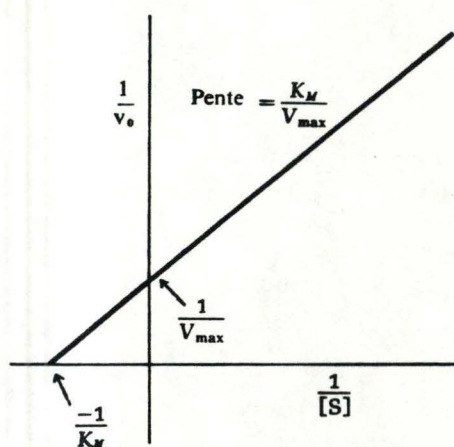
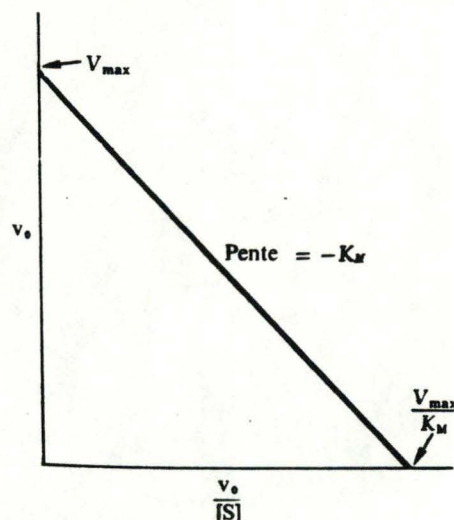


Figure B
Représentation d'Eadie-Hofstee.



6. Techniques biochimiques

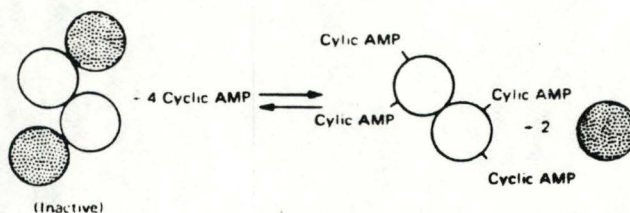
6.1 Méthode de phosphorylation "in vitro" par une protéine kinase exogène (Selon la méthode de Rudolph et Krueger, 1979) [90].

Principe.

La phosphorylation est le transfert catalysé par une protéine kinase, d'un groupe phosphate terminal d'un nucléotide (ATP) sur une protéine.

La protéine kinase A qui est utilisée ici, est un tétramère constitué de deux sous-unités C (catalytiques) et de deux sous-unités R (régulatrices) ; la structure étant R_2C_2 . L'enzyme sous forme native inactive, a un PM de 180.000 ; la masse moléculaire des sous-unités régulatrices s'étale de 80.000 à 110.000.

La kinase n'est active que sous forme dissociée, c'est-à-dire, lorsque les sous-unités C sont libres. La libération de celles-ci se fait en présence de AMPc comme représenté ci-dessous :



Les protéines hachurées correspondent aux domaines catalytiques ; les autres sont des régions régulatrices [50].

De plus, les sous-unités R de l'enzyme subissent une réaction d'autophosphorylation qui augmenterait l'affinité de l'enzyme pour l'AMPc et/ou faciliterait la dissociation de l'holoenzyme.

L'isotope radioactif qui nous permet de mesurer les phosphorylations de protéines, est du phosphore 32 (^{32}P). Son émission radioactive est de type β ; et sa demi-vie, de 14,7 jours. Dans le cadre de nos expériences *in vitro*, nous

(e) : Milieu réactionnel.

[γ - ^{32}P] ATP 50 μM

Tampon Pipès 50 mM pH 7,0

MgCl_2 10 mM

NaF 25 mM

Protéine kinase A = \pm 1000 U (1 U transfère une picomole de PO_4^{3-} à partir de [γ - ^{32}P]-ATP, sur la caséine à pH 6,5 et à 30°C).

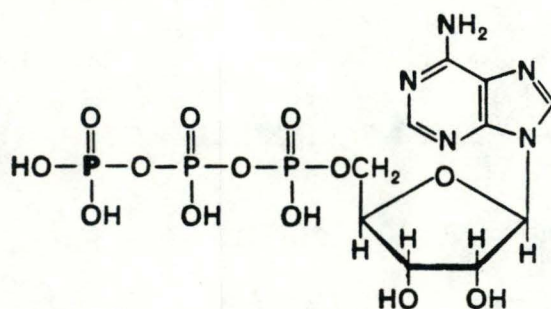
AMPc = 250 μM

Substrat : Branchies postérieures ou branchies antérieures = 2 mg

Histones de type II-A = 500 μg

Dans un volume final de 400 μl .

avons utilisé de l'adénosine 5'-[γ - ^{32}P]-triphosphate sous forme de sel de triéthylammonium (voir ci-dessous).



ATP marqué avec du ^{32}P sur le phosphate terminal.

Au départ, son activité spécifique est de 3.000 Ci/ mmole (111.10^{12} Bq/mmol) et la concentration radioactive est de 10 mCi/ ml (370.10^6 Bq/ ml).

Méthode .

Le milieu réactionnel se trouve ci-contre (@).

La mise en route des phosphorylations est commandée par l'addition de [γ - ^{32}P] - ATP auquel a été ajouté de l'ATP froid à concentration finale de 50 μM . La radioactivité a été calculée de manière à avoir environ 250 cpm/picomole d'ATP. Après un temps déterminé de réaction, 50 μl du milieu d'incubation sont déposés sur un papier filtre Whatman 3 MM. Ce papier est soumis à deux lavages de dix minutes dans le TCA 10 %, puis deux autres de 10 minutes dans de l'alcool dénaturé et finalement deux fois 10 minutes dans l'éther diéthylique. Le volume de ces bains est choisi pour avoir au minimum 5 ml de liquide par papier filtre. Ceux-ci sont ensuite séchés à l'aide d'un sèche-cheveux jusqu'à évaporation complète de l'éther. Ils sont mis alors dans des fioles de comptage contenant 4 ml de liquide scintillant Aqualuma plus qui transforme la radioactivité en photons. On effectue le comptage au compteur à scintillation liquide (Beckman).

On utilise pour le système de référence des histones de type II-A, substrat facilement phosphorylable.

Deux contrôles ont été réalisés :

- Il a été décrit que la sous-unité régulatrice (R) de la protéine kinase A peut s'autophosphoryler. Le premier contrôle consiste donc à quantifier cette autophosphorylation par un test dépourvu de substrat protéique. La valeur obtenue est soustraite de tous les tests.

- Le second contrôle nous assure que l'incorporation du PO_4^{3-} est due à l'activité de la protéine kinase A exogène. Ainsi, toutes les protéines kinases branchiales ont été inactivées par plusieurs opérations de "congélation-décongélation". Nous vérifions qu'aucune phosphorylation n'a eu lieu car nous ne détectons qu'un bruit de fond faible dû à l'adsorption aspécifique sur le papier. Celle-ci correspond aux "blancs" décrits ci-dessous. Ceux-ci sont réalisés en déposant sur le papier 45 μl de test sans ATP; les protéines kinases sont dénaturées dans un bain de TCA 10 %. Ensuite 5 μl de la

(@) : Mélange "5 fois concentré" : solubiliseur.

SDS 10 %

Tris 250 mM

2-β mercaptoéthanol 10 % ou DTT 3,5 %

Glycérol 50 %

Bleu de bromophénol 0,25 % ; pH 6,8

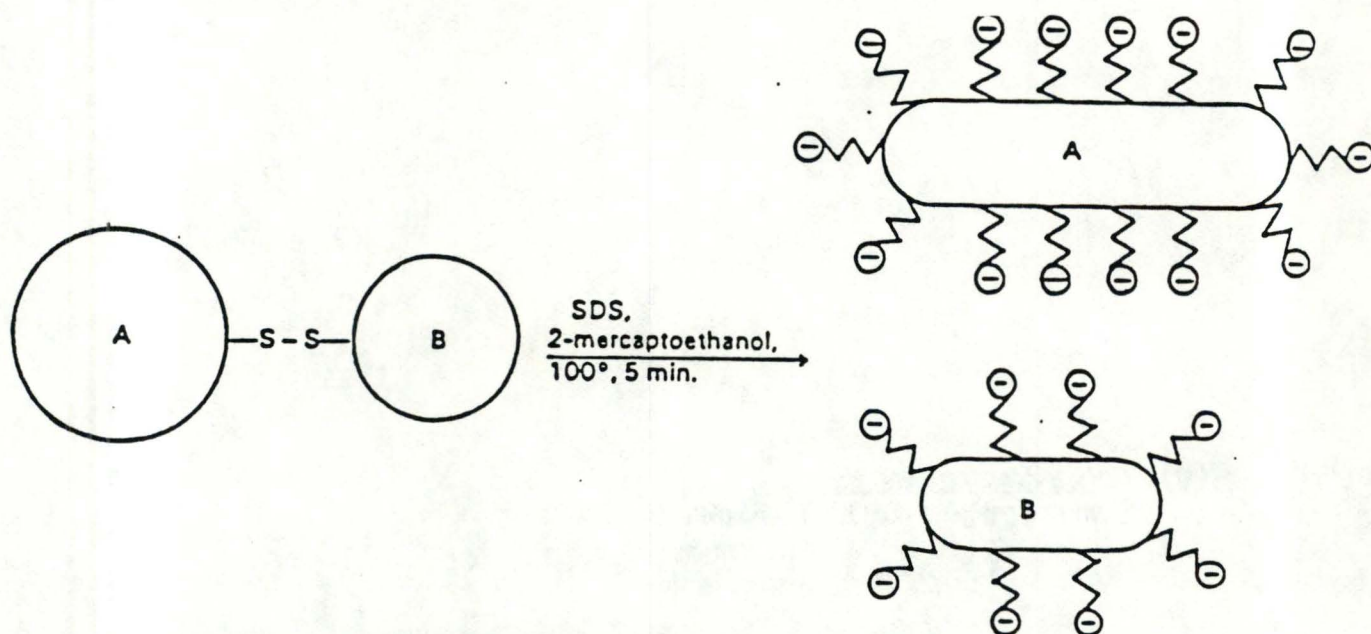
On met quatre parts d'échantillon pour une part de solubiliseur.

solution d'[γ - ^{32}P]-ATP sont ajoutés sur le papier et celui-ci subit les mêmes lavages que les papiers-test.

6.2 Préparation des échantillons pour l'électrophorèse.

Les protéines qui sont soumises à l'électrophorèse, sont solubilisées dans un mélange cinq fois concentré (x5) contenant ou non un réducteur (du 2- β mercaptoéthanol ou du DTT).

On fait bouillir le mélange cinq minutes. Cette étape consiste à dérouler les protéines par action de la chaleur et du SDS qui apporte des charges négatives à la molécule. Parallèlement, on décompose les protéines telles la PFK₁ en leurs sous-unités éventuelles, même si leur association est de nature covalente (action de la chaleur et du 2- β mercaptoéthanol, réducteur de ponts disulfures (figure ci-dessous)).



Action du SDS, du 2- β mercaptoéthanol et de la chaleur sur les protéines.

Le mélange "5 fois concentré" permet également d'alourdir l'échantillon par le glycérol et de suivre le front de migration au moyen du Bleu de bromophénol.

6.3 Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS).

Principe.

Cette technique est couramment utilisée pour l'analyse d'un mélange complexe de protéines. Elle permet en effet la séparation complète, sur base du poids moléculaire, des divers constituants de l'échantillon déposés au sommet du gel et cela, grâce à la réticulation de celui-ci et au courant qu'on lui applique.

Gel de polyacrylamide.

(Ω): Gels d'électrophorèse

*Running gel: 0,375 M Tris pH 8,8
: 10 % Acrylamide.
: 0,27 % Bisacrylamide.
: 0,1 % SDS
: 0,05 % Temed
: 0,05 % Persulfate d'ammonium

*Stacking gel: 0,125 M Tris pH 6,8
: 3 % Acrylamide.
: 0,08 % Bisacrylamide.
: 0,1 % SDS
: 0,05 % Temed
: 0,05 % Persulfate d'ammonium.

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes pontées avec du méthylène bisacrylamide. La polymérisation est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres, par exemple le persulfate d'ammonium, le NNN'N'-tétraméthylène diamine (TEMED). La réaction est inhibée en présence d'un excès d'O₂.

La réticulation du gel dépend du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide mis en présence. La mobilité électrophorétique des protéines diminue si la taille des pores diminue; l'influence de celle-ci sur la mobilité varie d'une protéine à l'autre car la charge et la taille des molécules interviennent dans la potentialité migratoire. Plus les molécules sont grosses, plus elles sont ralenties par le gel.

SDS-PAGE.

Le sodium dodécyl sulfate est un détergent anionique qui a pour propriété de rompre la structure tridimensionnelle des protéines. Quand les protéines sont dénaturées par la chaleur en présence d'un excès de SDS et d'un réducteur des ponts disulfures (2-β mercaptoéthanol), elles se déroulent et se voient entourées de molécules de SDS à raison de 1,3 à 1,4 g par gramme de protéines de sorte que chaque molécule a la même densité de charges négatives quelle que soit sa charge de départ. Les protéines ainsi traitées migrent dans un gel de polyacrylamide uniquement en fonction de leur taille.

Le gel de polyacrylamide se compose de deux parties : un running gel ou gel de séparation surmonté d'un stacking gel ou gel d'empilement.

Mode opératoire, d'après Laemmli (1970) [91].

Préparation des gels.

le protocole expérimental se trouve sur la page de gauche(α).

Les catalyseurs sont ajoutés au dernier moment.

Le running gel est à 10 % d'acrylamide.

Pendant la polymérisation du running gel, ce dernier est surmonté d'alcool isolamylique pour éviter son contact avec l'O₂.

Le stacking gel (3 %) est ensuite coulé au moment d'insérer le peigne qui moulera les 10 puits. Les échantillons sont déposés à raison de 4 à 10 µl par piste.

Parallèlement à ceux-ci, on fait migrer des protéines de PM connu.

Etalons Pharmacia

	<u>PM</u>
Phosphorylase b	94.000
Albumine sérique bovine	67.000
Ovalbumine	43.000
Anhydrase carbonique	30.000
Inhibiteur de trypsine (soja)	20.100
α-lactalbumine	14.400

Le contenu d'une fiole est solubilisé dans 100 µl de tampon Tris 0,5 M pH 6,8.

(Ω): Tampon électrophorèse.

Tris	0,025 M	
Glycine	0,192 M	
SDS	0,1 %	pH 8,3

(Θ): Protocole expérimental.

La solution stock est constituée de 100 ml contenant 30 g d'acrylamide et 0,8 g de bis-acrylamide.

Gel de séparation

	Solution lourde	Solution légère
Solution "stock"	20 ml	9,3 ml
Tris 2 M pH 8,8	8 ml	8 ml
TEMED	16,5 μ l	16,5 μ l
Saccharose 40 %	6 ml	-
H ₂ O bidistillée	10 ml	26,7 ml
SDS 10 %	0,4 ml	0,4 ml
Persulfate d'ammonium 10%(P/V)	0,1 ml	0,1 ml

Gel d'empilement

Solution "stock"	8 ml
Tris 0,5 M pH 6,8	6 ml
TEMED	25 μ l
H ₂ O bidistillée	59 ml
SDS 10 %	0,6 ml
Persulfate d'ammonium 10%(P/V)	0,4 ml

On dépose 4 μ l de ce stock dilué 5 fois, par puits.

Etalons Amersham Rainbow marqués au ^{14}C

	<u>PM</u>	<u>couleur</u>
Myosine	200.000	bleu
Phosphorylase b	92.500	brun
Albumine sérique bovine	69.000	rouge
Ovalbumine	46.000	Jaune
Anhydrase carbonique	30.000	orange
Inhibiteur de trypsine	21.500	vert
Lysozyme	14.300	magenta

On dépose deux μ l de ce stock par puits.

Migration.

La cuve à électrophorèse (Mini PROTEAN II slab cell de chez Bio-Rad) est remplie de tampon (Ω).

6.4 Electrophorèse SDS-PAGE en gradient (6.25 - 13.5 %).

Principe

L'électrophorèse SDS-PAGE en gradient présente l'avantage d'une réticulation croissante du gel. Par ce fait, elle permet une meilleure séparation des protéines de PM très différents.

Préparation des gels.

Le protocole expérimental est présenté sur la page de gauche (@). La polymérisation est amorcée par une réaction entre le TEMED et le persulfate d'ammonium. L'activation par le TEMED permet d'attaquer les doubles liaisons de l'acrylamide et du bisacrylamide et de produire ainsi une réticulation dans les trois dimensions.

Préparation des plaques de coulage des gels.

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre séparées par des espaceurs de 0,7 mm d'épaisseur. Les plaques sont soigneusement dégraissées avec de l'acétone avant l'assemblage; elles sont ensuite glissées dans un appareil Pharmacia (GSC-2) placé de niveau. Le gradient est réalisé en versant 38 ml de chaque solution (légère et lourde) dans les deux compartiments du mélangeur, la solution légère devant être dans celui qui est proche de la sortie en veillant bien à ce que la communication entre les deux soit fermée. Une fois les deux solutions versées dans leurs compartiments respectifs, la communication entre ceux-ci est ouverte, le mélangeur est mis en route et la vis de serrage proche des plaques est réglée afin d'obtenir un bon débit. Dès que les compartiments sont vides, ils sont remplis avec du glycérol 50 % (V/V) coloré par du Bleu de bromophénol. Son rôle est de pousser l'acrylamide

resté dans le treillis sous les plaques. Nous déposons quelques gouttes d'alcool isoamylique au-dessus du gel pour créer une surface plane. Ce gel doit polymériser une heure au moins. Avant de verser le gel d'empilement au-dessus du gel de séparation, toute trace d'alcool doit être éliminée. Les plaques sont remplies jusqu'au sommet avec ce second gel et nous plaçons les peignes qui détermineront des "puits" ($\pm 35 \mu\text{l}$) où les échantillons seront déposés. Cette seconde polymérisation requiert douze heures à 4° C.

Electrophorèse et migration des protéines

Le tampon est le même que pour l'électrophorèse SDS-PAGE (voir point 6.3 de "Matériel et méthodes"). On le verse délicatement sur le sommet des plaques. Un courant de 150 Volts est appliqué pendant 16 heures (ou 500 Volts pendant cinq heures).

6.5 Coloration des gels.

Au Bleu de Coomassie.

Le gel dénaturé est fixé et coloré avec une solution d'acide acétique glacial 10 %, de méthanol 40 % et de Bleu de Coomassie R-250 0,1 %. Le gel est plusieurs fois décoloré avec la même solution sans le colorant.

A l'argent.

Cette technique est inspirée de la méthode de Merril (1979) [92].

Après migration, les protéines sont fixées en immergeant le gel dans une solution de méthanol 50 % - acide acétique glacial 12 % pendant 30 minutes. Afin d'éliminer l'excès de SDS et de permettre au gel de se décontracter avant la coloration, il est rincé trois fois 10 minutes dans des bains contenant de l'éthanol 10 % - Acide acétique glacial 5 %.

Ensuite, les protéines sont oxydées dans un bain de bichromate de potassium 3,4 mM - acide nitrique 3,2 mM pendant 15 minutes. Le gel est lavé trois fois 30 minutes dans l'eau distillée, plongé dans le nitrate d'argent 20 mM pendant 30 minutes puis lavé dans l'eau distillée. Après quelques minutes d'immersion dans la solution réductrice de développement (carbonate de sodium 0,28 M - formaldéhyde 9 mM), les bandes protéiques apparaissent. La réaction est arrêtée dans l'acide acétique glacial 3 %. Le gel est stocké dans le méthanol 30 % - glycérol 3 % avant d'être séché sous vide.

6.6 Sèchage des gels.

Celui-ci se fait sous vide dans un appareil Pharmacia (GSD-4) prévu à cet effet.

Le gel est préalablement déshydraté 30 minutes dans du méthanol 50 % (V/V) puis placé entre cellophanes humidifiés par la même solution. Le sèchage peut être accéléré en disposant une source de chaleur au-dessus de l'appareil sauf pour la coloration à l'Ag.

(Ω) : - **Révélation du film après exposition**

- Révélateur Kodak (5 minutes).
- Bain d'arrêt (H₂O) (1 minute).
- Fixateur Kodak (10 minutes).

La plaque est abondamment rincée à l'eau et séchée.

(@) : **Test anticorps sur blotting.**

- Les blottings sont incubés une heure à 37°C dans du PBS + BSA 3 % afin de saturer les sites éventuellement libres de fixer de manière aspécifique des Ac ou n'importe quelles protéines pouvant être reconnues par l'Ac 2.
- Les blottings sont alors lavés trois fois 10 minutes ou cinq fois 5 minutes dans des bains de PBS + Tween 20 0,1 %. Agitation forte.
- Ensuite, les pistes des blottings sont découpées (attention, elles sont fragiles !) et mises dans des tubes avec l'Ac 1 à dilution souhaitée (Volume = 2,5 ml) - Incuber une heure à température ambiante sous faible dilution ambiante - secouage faible.
Les Ac 1 sont dilués dans du PBS + BSA 1 % qui est filtré pour éviter les traînées sur le blotting).
- Après incubation avec l'Ac 1 - cinq lavages de 5 minutes dans PBS + Tween 20 0,1 %. Agitation forte.
- Mise en contact avec l'Ac 2. La dilution conseillée par Amersham est de 1/300 et se fait dans PBS - BSA 1 % filtré (volume = 2,5 ml).
- Incuber les Ac 2 une heure à température ambiante sous faible agitation.
- Laver cinq fois 5 minutes dans PBS - Tween 20 0,1 % - Agitation forte.
- Mettre en contact avec le substrat (DAB) pendant 15 minutes.
Préparation du substrat DAB : - Tris 0,1 M pH 6,8
- DAB : 0,5 mg/ml
Filtrer - Ajouter 1 µl de H₂O₂ extemporanément
Mettre 2,5 ml / tube de cette mixture - agitation faible
- Arrêter la réaction en plongeant les blottings dans HCl 1 N

6.7 Autoradiographies .

Elles sont réalisées sur des gels d'électrophorèse SDS-PAGE 10 %. Après migration, le gel est démoulé et mis dans du TCA 12 % pendant 15 minutes. Ensuite, on le déshydrate 30 minutes dans un bain de méthanol 50 %, ce qui permet un séchage plus rapide. L'étape suivante est l'immersion pendant 30 minutes dans du Enlighting qui contient un liquide scintillant permettant la conversion du rayonnement β en photons, et un fixateur. Tout ceci est suivi d'un séchage comme après la coloration au Bleu de Coomassie. Le gel est alors mis en contact avec un film radiographique XAR-5 dans une cassette Kodak X-omatic prévue à cet effet. L'exposition se fait à -80°C et sa durée est à déterminer selon la quantité de matériel radioactif déposé sur le gel. Après exposition, le film est révélé après qu'il soit revenu à température ambiante(Ω).

7. Techniques biochimiques et immunologiques.

7.1 Le "Dot-blot".

Cette variante du test ELISA se réalise sur une membrane-support. Les résultats obtenus sont qualitatifs. Quelques μl de solution d'Ag sont déposés sur une membrane de nitrocellulose. Après une étape de saturation, la membrane porteuse de l'Ag est incubée en présence du premier Ac, lavée, puis incubée en présence du deuxième Ac couplé à un enzyme. La réaction s'effectue en plaçant cette membrane dans une solution contenant l' H_2O_2 et un chromogène. En présence d'eau oxygénée, le chromogène est oxydé et donne un produit coloré [93]. Ce type de test a été utilisé pour détecter la présence d'Ac anti-PFK $_M$ dans les polysera de rats.

Méthode .

Après dépôt de quelques μl de solution antigénique sur une membrane de nitrocellulose, on suit le protocole décrit sur la page de gauche (@).

7.2. Test ELISA.

Des "immunoassays" utilisant des moyens enzymatiques furent pour la première fois décrits par Engvall et Perlmann en 1971. Ils leur donnèrent le nom d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [94]. Le type de test ELISA utilisé pour détecter la présence d'anticorps anti-PFK $_M$ consiste à faire adsorber l'Ag dans les puits d'une plaque de microtitration. Les

(Ω) : **Protocole expérimental.**

1. Dépôt de l'antigène.

100 µl de solution antigénique (5-10 mg de protéines/ ml) sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration et incubés overnight à 4°C (ou trois heures à température ambiante), permettant ainsi à l'Ag de s'adsorber. On recouvre la plaque d'un parafilm pour éviter l'évaporation.

2. Saturation.

Les puits sont vidés de la solution d'Ag; après trois lavages avec une solution tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20, ils sont remplis d'une solution de BSA 3 % dissoute dans du PBS. La plaque est laissée une heure à 37°C. Cette étape permet de bloquer les sites restant non saturés et d'éviter ainsi l'adsorption non spécifique des Ac primaires et secondaires sur le support solide.

3. Dépôt du premier Ac.

100 µl de sérum polyclonal de rat, dilué de manière appropriée dans une solution de PBS contenant 1 % de BSA, sont déposés dans chaque puits. La plaque est mise à incuber pendant une heure à 37°C.

4. Lavages.

Ils sont réalisés dans une solution tampon (PBS).

5. Dépôt du deuxième Ac.

50 µl d'un Ac couplé à la peroxydase, dilué 1000 fois dans la même solution que pour le premier Ac, sont déposés dans les puits. Incubation : une à trois heures à 37°C.

6. Lavages dans une solution tampon (PBS).

7. Révélation.

Ajout de 100 µl d'une solution d'ABTS-H₂O₂ par puits. Laisser incuber 15 minutes à 37°C.

Solution ABTS-H₂O₂ : -ABTS

-H₂O₂ 30 %

-Tampon citrate = Na₂HPO₄.2H₂O 20,5 g/l

Acide citrique 8,9 g/l

pH 5,6

Dissoudre 4,2 mg d'ABTS dans 5,6 ml de tampon citrate.

Ajouter 5 µl d'H₂O₂ dans ce mélange. La solution est préparée extemporanément

8. Lecture.

Elle est réalisée par un lecteur ELISA titertek, l'absorbance est réglée à 410 nm car le produit de la réaction présente à cette longueur d'onde un maximum d'absorption.

(@) : **Composition du tampon de Western blot.**

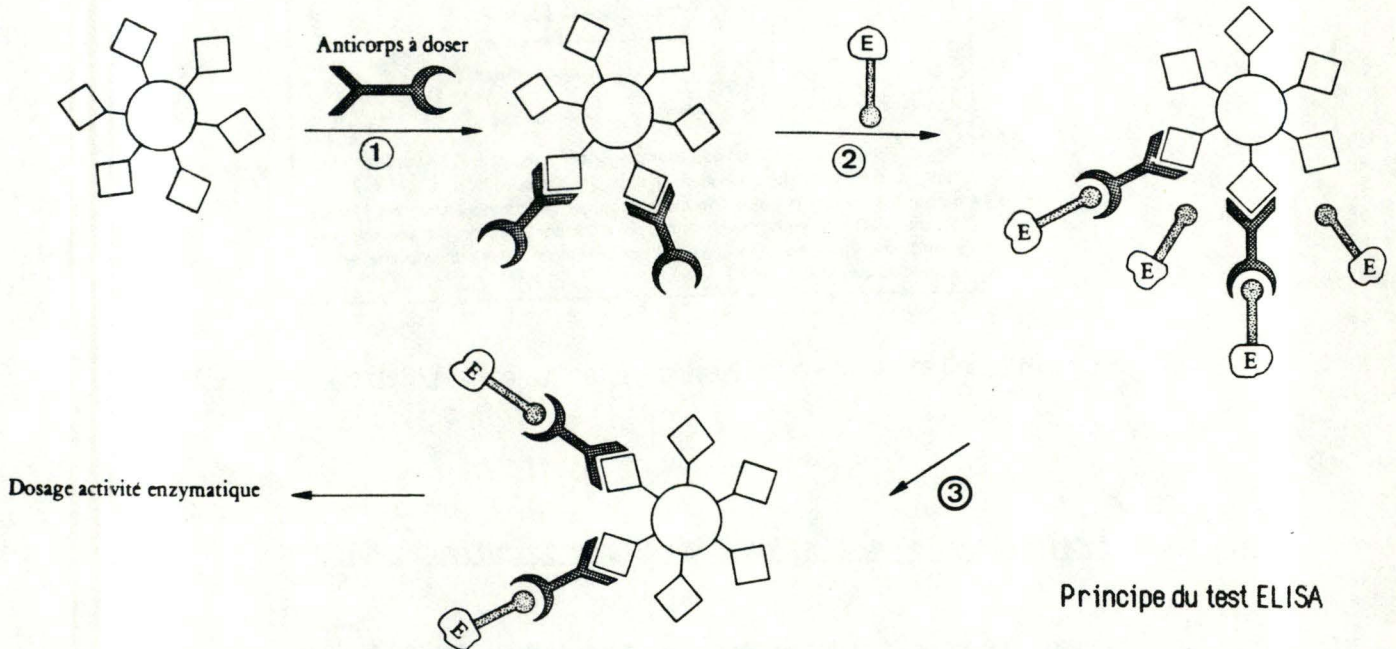
Tris 3,085 g

Glycine 14,41 g

Méthanol 200 ml

H₂O dist. 800 ml

antisera sont ensuite incubés dans chaque puits, l'excès d'Ac non fixé est lavé. La présence d'Ac fixés est révélée par la liaison d'un deuxième Ac couplé à un enzyme et reconnaissant le premier : l'activité enzymatique étant quantifiée par la conversion, catalysée par l'enzyme, d'une substance peu colorée en un dérivé très coloré (figure ci-dessous).



Mis au point, le test est rapide et sûr : 400 à 500 échantillons peuvent être facilement testés en huit heures. Ce type de test a donc été utilisé pour la détection des Ac polyclonaux.

Nous donnons un protocole du test utilisé sur la page de gauche (Ω).

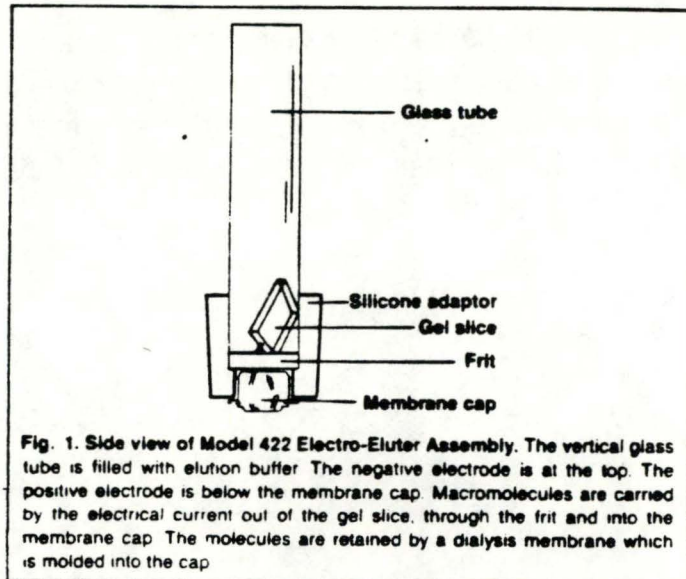
7.3. "Western blot" (blotting).

Après électrophorèse SDS-PAGE, le gel est démoulé et équilibré dans un tampon de blotting (@). Il est ensuite recouvert d'une feuille de nitrocellulose. Deux feuilles de papier Wathman sont déposées de part et d'autre. Ce dispositif est immergé dans le tampon de blotting contenu par le "Trans-Blot cell" (Bio-Rad) et soumis à un champ électrique de 100 Volts durant une heure afin de transférer les protéines du gel sur la membrane de nitrocellulose.

7.4. "Immunoblot".

Cette technique permet la réaction Ag-Ac sur un pattern électrophorétique. Ceci après transfert sur une membrane de nitrocellulose.

Méthode : Les blottings sont incubés overnight à 4°C dans du PBS- NP40 3 % (V/V). Celui-ci, un détergent, permet de colorer la nitrocellulose à l'Amidoschwarz sans rétrécissement et diminue le bruit de fond.



Représentation schématique de "electro-eluter" (modèle 422 de chez Bio-Rad).

(Ω) : Protocole d'un gel d'affinité Sépharose 4B activé au CNBr.

- * Peser la quantité requise de Sépharose 4 B activé au CNBr et la mettre en suspension dans HCl 1 mM pendant 15 minutes : 1 gramme de poudre donne environ 3,5 ml de gel
- * Laver le gel sur un verre frité (porosité G 3) avec la même solution (200 ml/g de gel sec).
- * Mettre la PFK_M électro-éluée dans un tampon de couplage (NaHCO₃ 0,1 M) à pH 8,3 contenant du NaCl (0,5 M) : environ 5 à 10 mg de protéines par ml de gel sec).
- * Mélanger la solution de protéines avec la suspension du gel au moyen d'un mélangeur rotatif (deux heures à température ambiante ou "overnight" à 4°C).
- * Bloquer les groupements actifs restant avec un tampon Tris 0,1 M, pH 8 pendant deux heures à température ambiante ou 16 heures à 4°C.
- * Laver l'excès de protéines adsorbées en alternant le pH par trois cycles faits de tampon acétate 0,1 M, pH 4 contenant NaCl 0,5 M suivi par le tampon de couplage pH 8,3.
- * Laver l'agent bloquant avec le tampon de couplage.
- * Mettre le gel d'affinité dans du PBS et le stocker à 4°C

Ensuite, on reprend le protocole expérimental utilisé lors du "Dot-blot" (p.45).

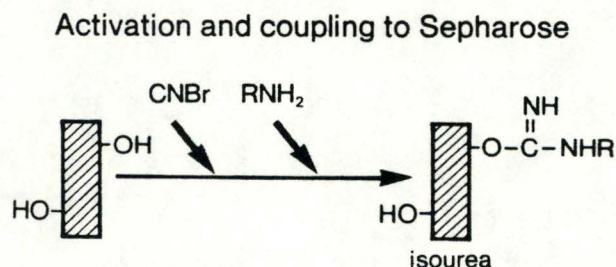
7.5 Electro-élution.

Afin de récupérer la PFK_M localisée sur un gel préparatif duquel on l'a découpée (photographie 10), nous employons la technique de l'électro-élution (Modèle 422 d'"Electro-eluter" de chez Bio-Rad).

Le principe est le suivant : les protéines (PFK_M) fixées et colorées au Bleu de Coomassie se sont entourées de SDS lors de l'électrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide. Elles sont donc négatives et sous l'action d'un courant électrique, elles migrent à travers un verre frité vers la borne positive (anode). Nous les récupérons sur une membrane de dialyse (figure ci-contre).

7.6 Préparation d'un gel d'affinité [95] (Ω).

Nous décrivons ici la méthode de couplage des ligands à un gel sépharose 4 B qui est préalablement activé au CNBr. Notre but est de greffer la PFK_M électro-éluée du côté NH₂-terminal (figure ci-dessous).



Activation et couplage au sépharose [95].

Elution des Anticorps .

Les sérums de rats immunisés (i) et préimmunisés (Pi) sont déposés sur la colonne contenant le gel d'affinité. Les protéines qui ne s'accrochent pas sont récupérées avec du PBS. L'éluion des anticorps anti- PFK_M se fait au moyen d'un détecteur UV (LKB) à 220 nm (longueur d'onde à laquelle la liaison peptidique des protéines absorbe la lumière) avec un tampon glycine- 0,1 M, ajusté à pH 2,5 avec HCl. Les anticorps sont ensuite remis à pH 7,5 avec du Tris.

RESULTATS

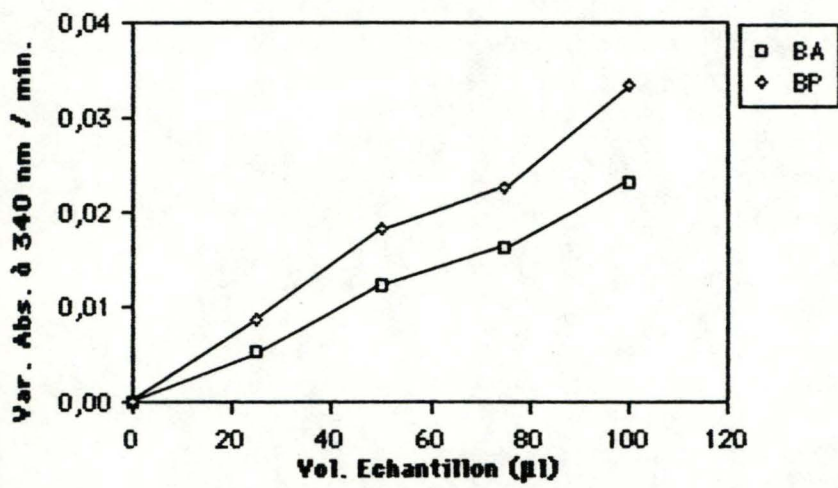


Fig. 1: Augmentation de l'Abs. à 340 nm/min. en fonction du volume d'extrait (source de PFK₁)

Le lecteur doit savoir en commençant cette rubrique "résultats" que chaque présentation des faits est suivie d'un commentaire, une discussion générale se trouvant en fin de chapitre.

Chapitre 1: Etude cinétique.

L'étude cinétique assez brève que nous présentons ici a pour seul but de déceler une activité phosphofructokinase dans les branchies antérieures et postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce. La caractérisation de son affinité pour ses deux substrats et sa modulation par quelques effecteurs sont aussi abordées ici.

La composition du milieu dans lequel l'activité de l'enzyme est mesurée, ainsi que la technique de dosage elle-même sont décrites au point 5.2.3 de "matériel et méthodes". Lorsque des modifications y sont apportées, elles sont signalées dans le texte.

1.1 Activité phosphofructokinase dans les branchies d'*Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

1.1.1 Effet dose-réponse.

Le préliminaire de notre étude consiste à vérifier que dans les conditions de saturation en substrats (Fru-6-P et Mg-ATP), l'activité de l'enzyme est proportionnelle à sa concentration. Nous avons choisi des concentrations en substrats proches de celles décrites comme étant saturantes et non inhibantes en nucléotide (Mg-ATP) pour la PFK₁ musculaire de l'écrevisse *Orconectes limosus* [33].

La figure 1 reprend les résultats obtenus pour les deux types de branchies. Dans les deux cas, une augmentation de la quantité d'enzyme (exprimée par le volume d'échantillon), se traduit par une accélération proportionnelle de l'oxydation du NADH (voir point 5.2.3 de "Matériel et méthodes").

1.1.2 Caractère soluble de l'enzyme branchial.

Ayant décelé une activité phosphofructokinase, nous examinons sa localisation: cytoplasmique ou particulaire. Pour ce faire, nous mesurons l'activité enzymatique à pH 8,2 dans l'homogénat d'une part, dans le surnageant obtenu par centrifugation de 30 minutes à 15.000 X g (4°C) d'autre part. Le choix du pH se justifie par une activité supérieure à celle observée au pH physiologique ($\pm 7,0$)(fig.2).

Comme nous le montre le tableau 1, et en accord avec tous les résultats

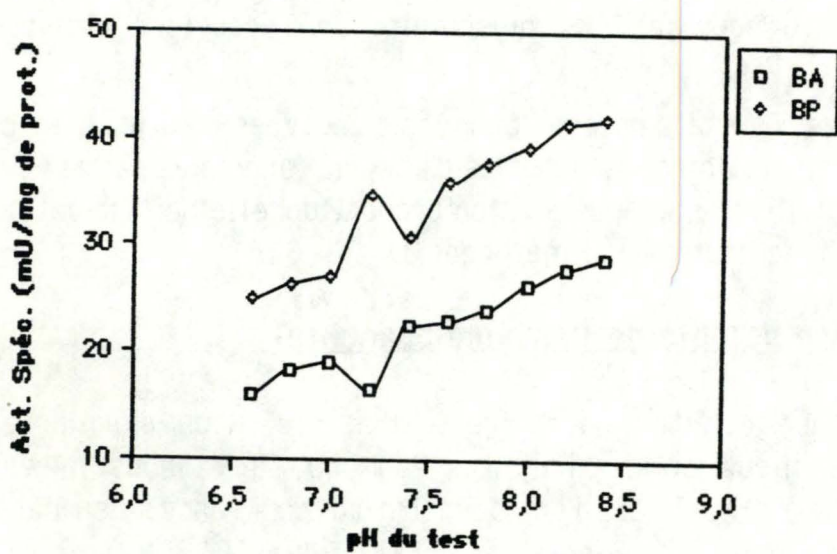


Fig. 2: Effet du pH sur l'activité spécifique des PFK₁branchiales

antérieurs [1,2], l'activité enzymatique décelée dans l'homogénat se retrouve entièrement dans le surnageant. Le fait qu'elle y soit plus élevée résulte vraisemblablement de la turbidité du test lors de la mesure de l'activité enzymatique dans l'homogénat, ce qui provoque une absorption aspécifique de la lumière transmise. Aucune activité n'est détectable dans le culot.

Caractère soluble de l'enzyme branchial

	Br. Ant.	Br. Post.
Act. Enz. dans l'homogénat total (U/g de tissu)	1,27	3,23
Act. Enz. dans le surnageant (U/g de tissu)	1,79	3,51

Tableau 1.

La PFK₁ étant cytosolique, le surnageant constituera par la suite la source d'enzyme. Il apparaît de plus que, pour une même quantité de tissu, l'activité mesurée dans les branchies postérieures est double de celle mesurée dans les branchies antérieures.

1.1.3 Effet du pH.

La figure 2 montre l'influence d'un pH allant de 6,6 à 8,4, sur l'activité spécifique de la PFK₁. Quel que soit le type de branchie, celle-ci augmente avec le pH : à pH 7,0, on retrouve 68 % de l'activité détectée à pH 8,2 dans les branchies antérieures et 65 % de celle-ci dans les branchies postérieures.

A pH basique (8,2), l'enzyme est insensible à certains régulateurs (fig. 9a et 9b). Cela justifie nos mesures ultérieures aux environs du pH physiologique. En outre, l'activité spécifique dans les branchies postérieures, est le double de celle rapportée dans les branchies antérieures.

1.2 Caractérisation de la PFK₁ branchiale.

Ce paragraphe concerne l'étude des profils cinétiques de l'enzyme

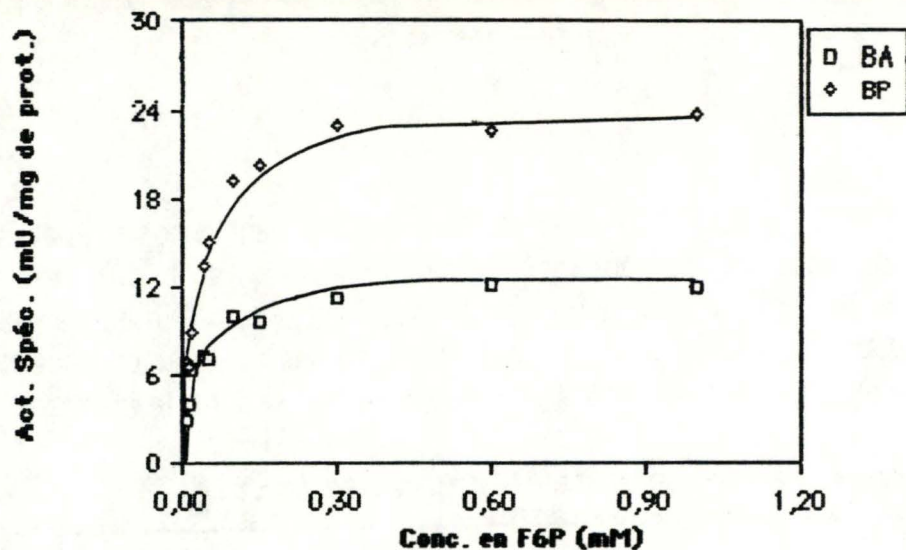


Fig. 3a: Effet de la concentration en Fru-6-P sur l'activité spécifique des PFK₁branchiales

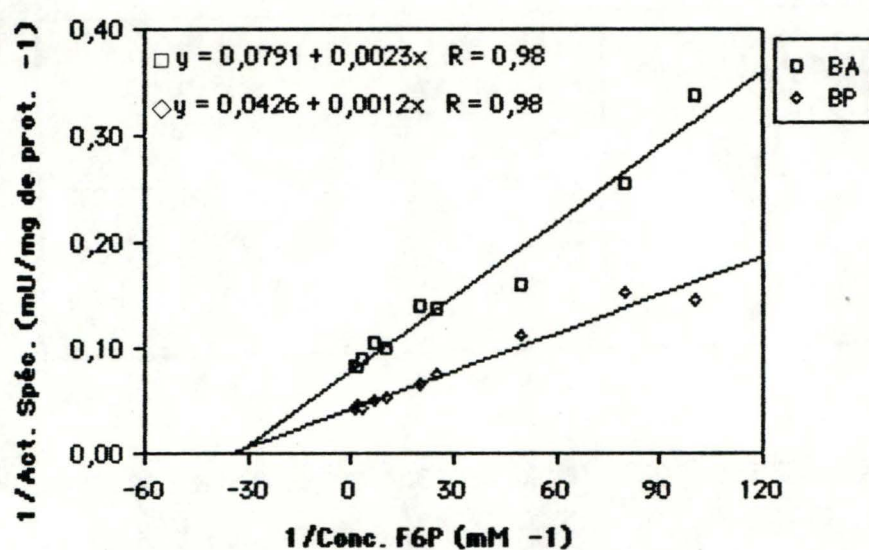


Fig. 3b: Transformation de Lineweaver-Burk pour le Fru-6-P

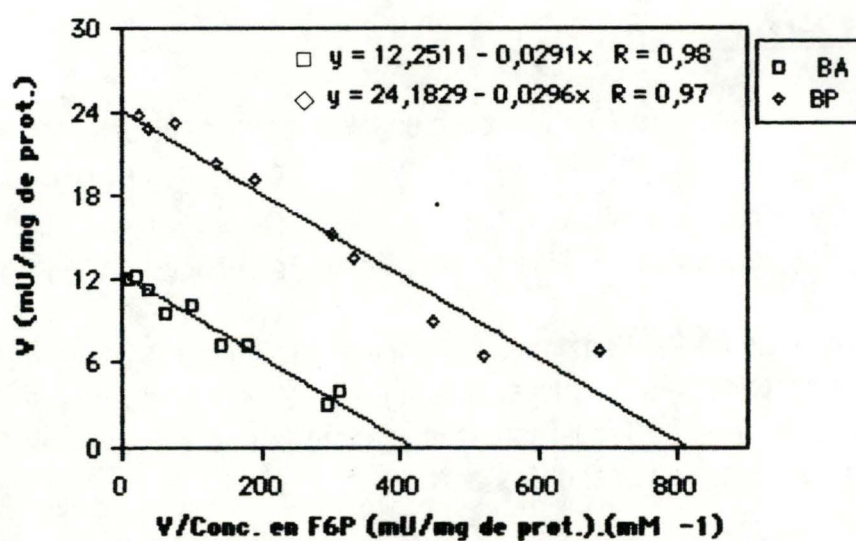


Fig. 3c: Transformation d'Eadie-Hofstee pour le Fru-6-P

branchial en fonction de ses deux substrats, le Fru-6-P et le Mg-ATP.

1.2.1 Effet de la concentration en Fru-6-P.

La fig. 3a montre l'évolution de l'activité spécifique de la PFK₁ de branchies antérieures et postérieures. On y observe une cinétique de type Michaelis-Menten. Quel que soit le type de branchie, l'activité maximale est atteinte lorsque la concentration en Fru-6-P est de 300 μ M.

Le Km et la Vmax sont déterminés à partir des transformations de Lineweaver-Burk (fig. 3b) et d'Eadie-Hofstee (fig. 3c) qui ont l'avantage de linéariser les cinétiques. La première permet d'établir la valeur de la Vmax avec une meilleure précision que la représentation directe de V en fonction de la concentration en Fru-6-P. La seconde, quant à elle, a l'avantage de déterminer simplement Vmax et Km.

Le tableau 2 ci-dessous, reprend la valeur moyenne de chacun des deux paramètres calculés à partir des deux méthodes.

Valeurs moyennes des Km et Vmax pour le Fru-6-P

	Br. Ant.	Br. Post.
Km (mM)	0,029	0,029
V max (mU/mg de prot.)	12,5	23,9

Tableau 2.

Ce qui ressort de ces résultats, c'est que l'activité enzymatique maximale est différente selon le type branchial. Elle est deux fois plus élevée dans les branchies postérieures alors que les Km sont manifestement égaux.

Notons ici que la concentration en Fru-6-P des tissus mammaliens et de ceux d'invertébrés est de l'ordre de 0,1 mM, soit environ 3,5 fois plus élevée que celle qui correspond au Km de l'enzyme [33,96]. Celle-ci n'est donc pas limitante.

Lorsque le test est réalisé en présence d'AMP, décrit comme activateur

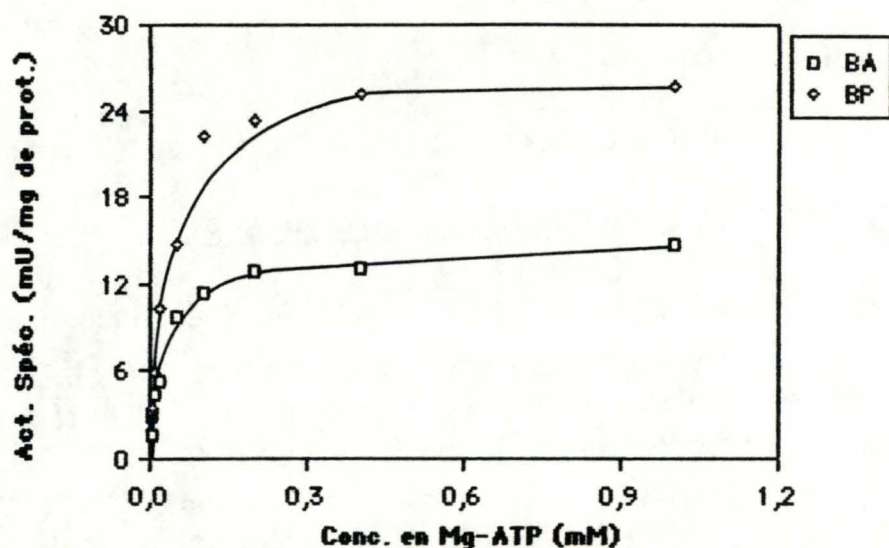


Fig 4a: Effet de la concentration en Mg-ATP sur l'activité des PFK₁ branchiales

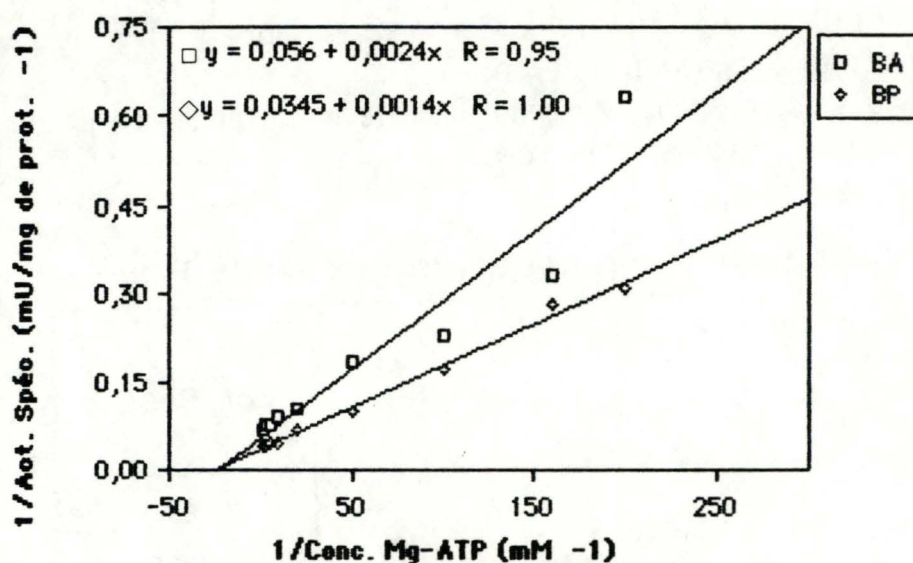


Fig. 4b: Transformation de Lineweaver-Burk pour le Mg-ATP

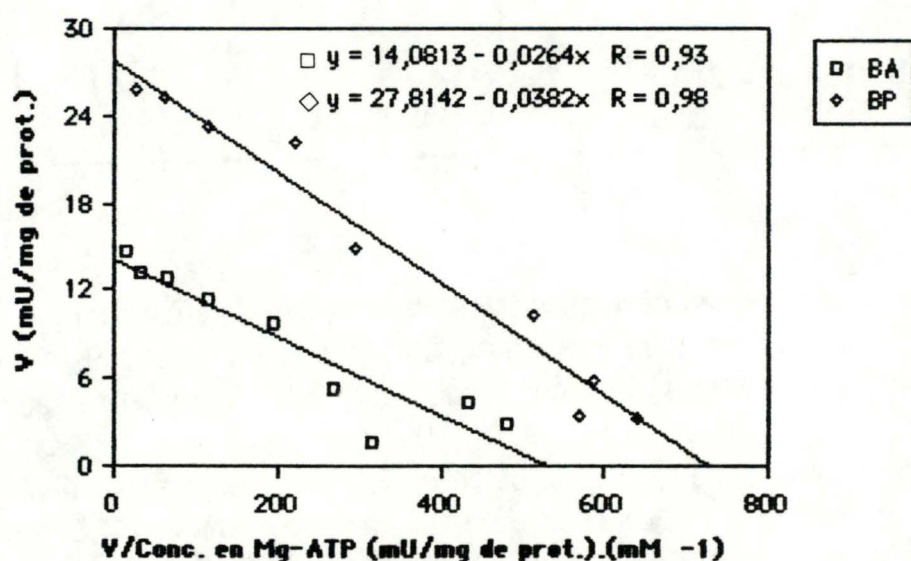


Fig. 4c: Transformation d'Eadie-Hofstee pour le Mg-ATP

allostérique de l'enzyme [33], nous observons une cinétique de type hyperbolique.

1.2.2 Effet de la concentration en Mg-ATP.

Le complexe Mg-ATP étant source de PO_4^{3-} pour la PFK₁ des tissus animaux, il est essentiel d'examiner l'affinité de l'enzyme pour celui-ci. La figure 4a montre qu'à Vmax, l'activité spécifique est pratiquement doublée dans les branchies postérieures. Les valeurs du Km et des Vmax ont été déterminées de la même manière que pour le Fru-6-P (fig. 4b et 4c). Elles sont reprises dans le tableau 3.

Valeurs moyennes des Km et Vmax pour le Mg-ATP

	Br. Ant.	Br. Post.
Km (mM)	0,034	0,040
V max (mU/mg de prot.)	16,0	28,4

Tableau 3.

Ici également, les Vmax sont différentes alors que les Km sont égaux. La concentration en ATP des tissus animaux se situe entre 2 et 10 mM [33, 96]. Celle que nous avons choisi pour ce test se situe donc bien en dessous de ces limites.

Comme les concentrations physiologiques de ce substrat inhibent de nombreuses PFK₁ de vertébrés et d'invertébrés, nous examinons au paragraphe suivant ce qu'il en est pour l'enzyme branchial.

1.3 Modulation de l'enzyme branchial.

Deux types de modulation ont été examinés. Tout d'abord, l'action exercée par les deux effecteurs négatifs ubiquistes chez les vertébrés (l'ATP et le

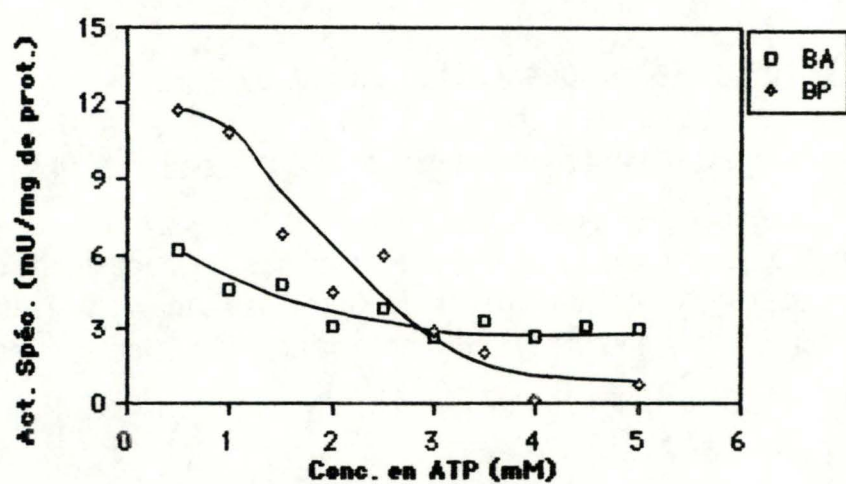


Fig. 5: Effet de la concentration en ATP sur l'activité spécifique des PFK_{branchiales}

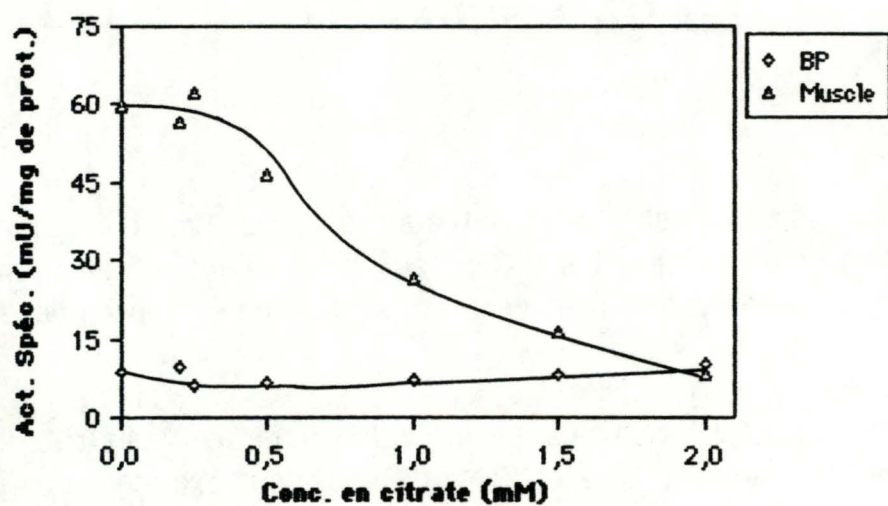


Fig. 6: Effet de la concentration en citrate sur l'activité spécifique des PFK_{branchiales}

citrate) et ensuite celle de deux nucléotides à adénosine, l'AMP et l'ADP.

1.3.1 Effet des concentrations physiologiques en ATP .

Ces tests sont réalisés dans les conditions décrites par Castaño [voir point 5.2.3 de "matériel et méthodes"]. Toutefois, nous avons omis l'AMP du test. En effet, comme le montre certaines études [22,29,30], ce nucléotide peut lever l'inhibition induite par l'ATP.

Les résultats obtenus pour les PFK₁ des deux types branchiaux sont repris à la figure 5. Quelle que soit l'origine de la PFK₁, l'activité enzymatique est inhibée par l'ATP à concentration physiologique. C'est la PFK₁ de branchies postérieures qui est la plus affectée; ainsi, pour une concentration en ATP de 5 mM, elle ne présente plus que 4 % de son activité mesurée en présence d'ATP à 0,5 mM; dans les mêmes conditions, la PFK des branchies postérieures présente encore 49 % de son activité. Sur ce même graphique, nous avons déterminé les valeurs du coefficient I_{0,5}, elles sont sensiblement différentes (tableau 4). Ceci constitue peut-être un mode de régulation distinct suivant le type de branchie.

Détermination graphique du I_{0,5}

	Br. Ant.	Br. Post.
I _{0,5} (mM)	1,42	2,15

Tableau 4.

1.3.2 Effet du citrate .

Comme l'ATP, le citrate est un inhibiteur de l'enzyme des vertébrés. Il signale, par rétroinhibition, un excès d'éléments biosynthétiques dans la cellule (voir point 2.1 de "introduction").

La figure 6 montre l'effet de concentrations croissantes en citrate sur de la PFK₁ purifiée à partir du muscle de lapin et sur de la PFK₁ de branchies postérieures d'*Eriocheir sinensis*. L'AMP a été également omis pour les mêmes raisons que pour l'ATP .

Comme l'ont montré de nombreuses études, la PFK₁ musculaire est inhibée par

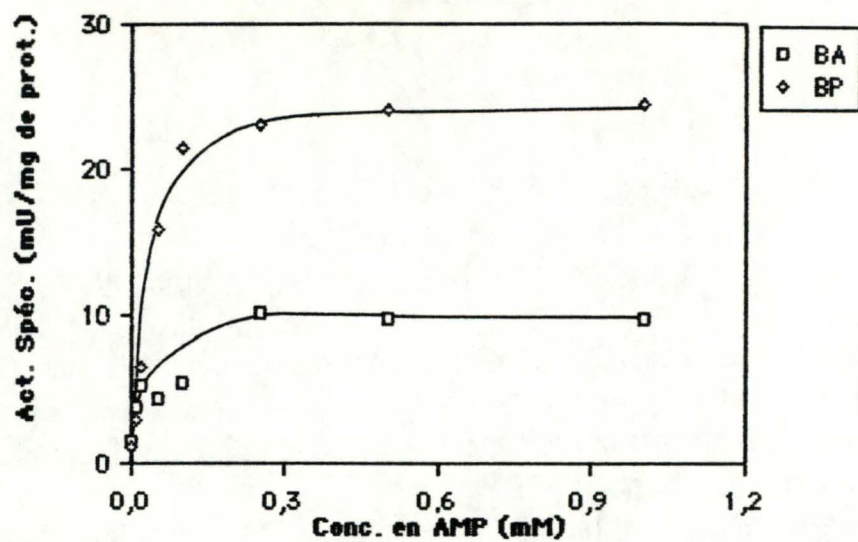


Fig. 7a: Effet de la concentration en AMP sur l'activité spécifique des PFK₁ branchiales

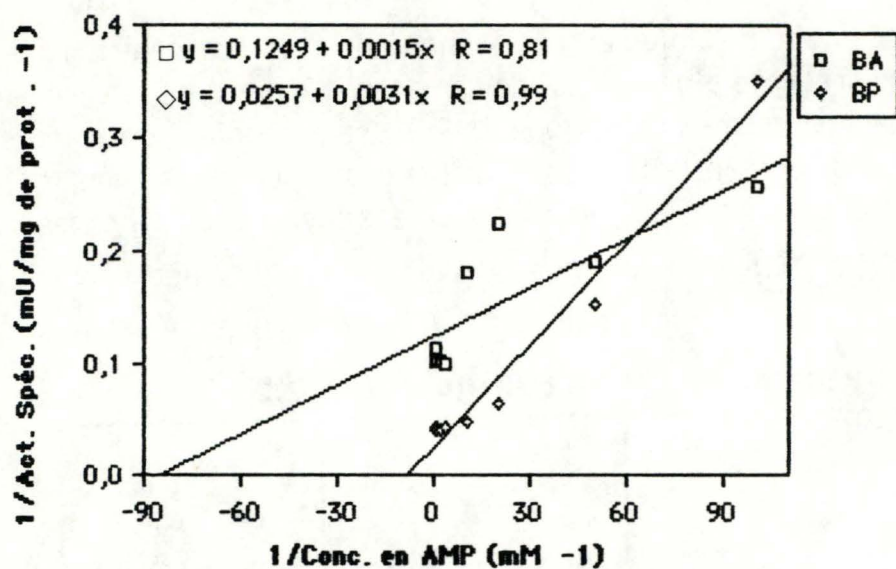


Fig. 7b: Transformation de Lineweaver-Burk pour l'AMP

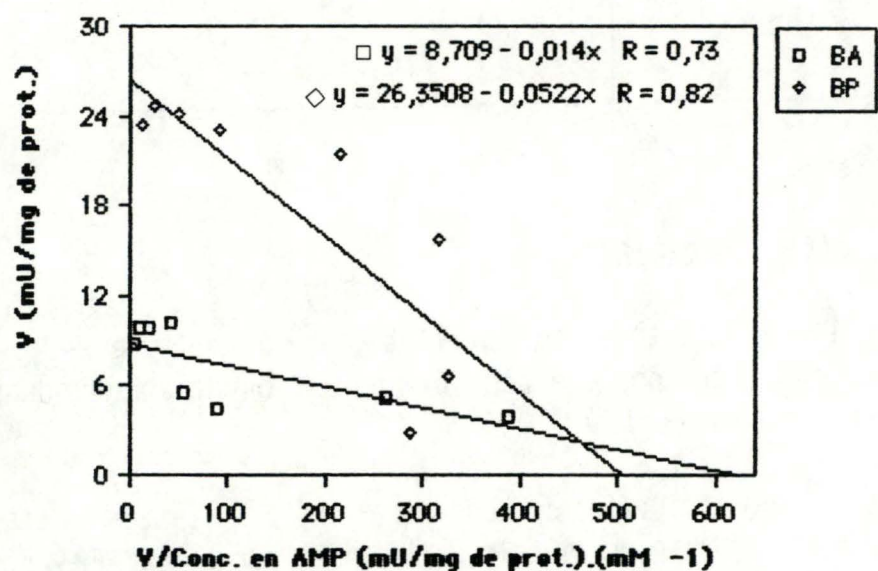


Fig. 7c: Transformation d'Eadie-Hofstee pour l'AMP

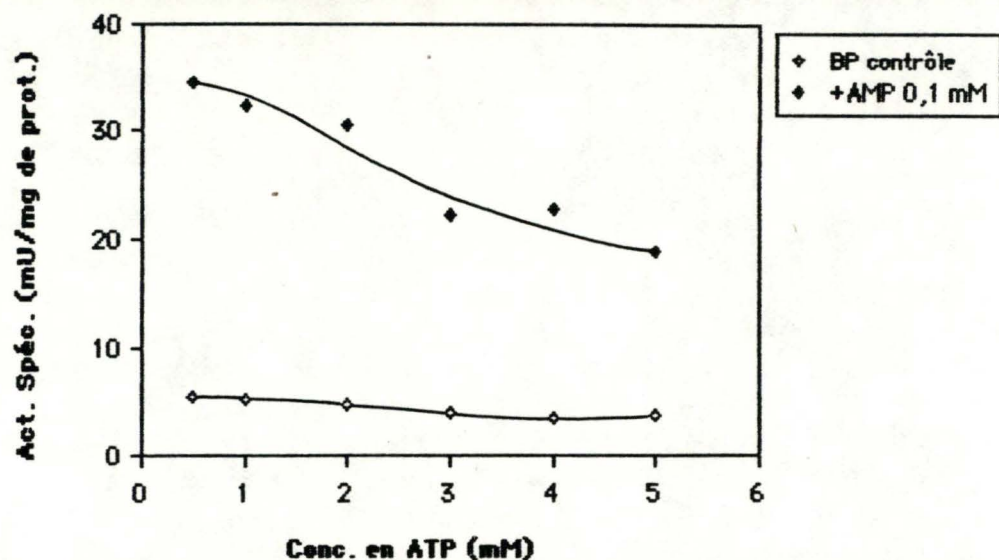


Fig. 8: Effet de la concentration en ATP sur l'activité spécifique de la PFK₁(BP): rôle de l'AMP

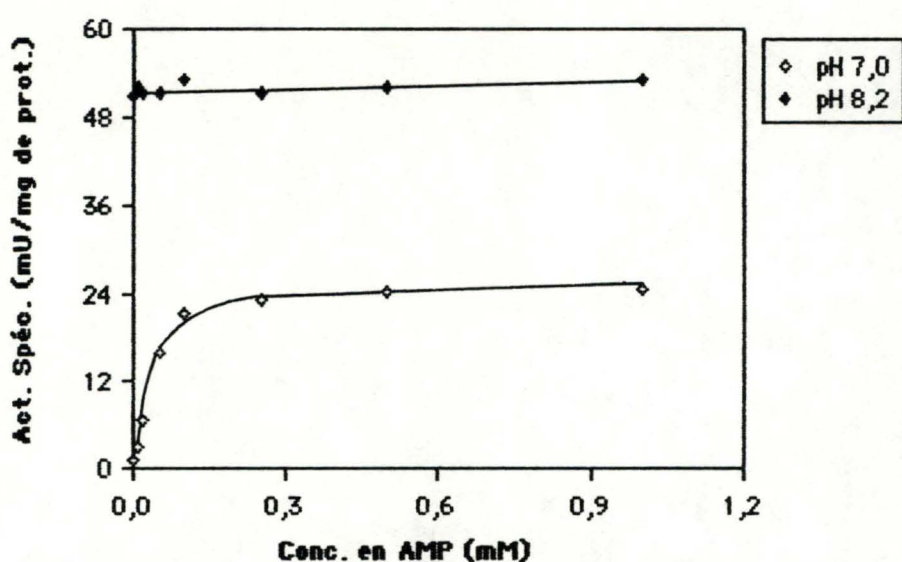


Fig. 9a: Effet de l'AMP sur l'activité spécifique de la PFK₁(BP) à deux pH

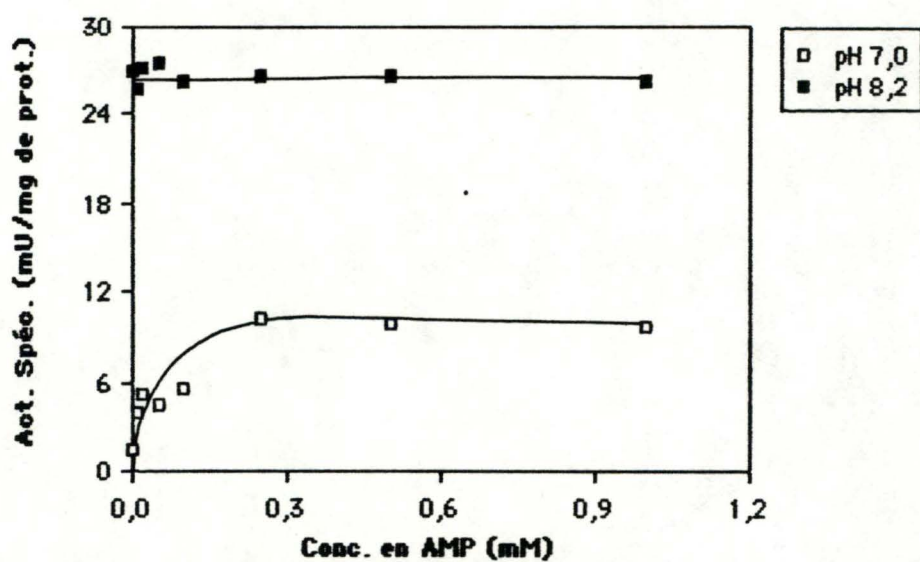


Fig. 9b: Effet de l'AMP sur l'activité spécifique de la PFK₁(BA) à deux pH

le citrate [22]. Par contre, celui-ci n'a pas d'effet sur l'enzyme branchial.

Ces résultats montrent que ce signal, au contraire de ce qui s'observe chez les vertébrés, en tout cas les mammifères, n'est pas présent chez *Eriocheir sinensis*.

1.3.3 Effet de l'AMP et de l'ADP.

A. L'AMP .

Les cinétiques sont effectuées à une concentration en ATP qui mime les conditions physiologiques, soit 3 mM. Comme l'illustre la figure 7a, l'AMP active environ 23 fois l'enzyme des branchies postérieures. Pour les branchies antérieures, le facteur d'amplification de l'activité n'est que de 6. Cette différence semble refléter une capacité de modulation plus grande pour l'enzyme des branchies postérieures à mettre en relation avec la plus grande inhibition de l'enzyme par l'ATP (fig.5).

Etant donné que les cinétiques sont de type Michaelis-Menten, les deux transformations déjà utilisées ont été reprises pour calculer le K_a de l'enzyme pour ce nucléotide (fig 7b et 7c). Les valeurs moyennes obtenues pour les deux paramètres (K_a et V_{max}) sont reprises au tableau 5.

Valeurs moyennes des K_a et V_{max} pour l'AMP

	Br. Ant.	Br. Post.
K_a (mM)	0,013	0,086
V_{max} (mU/mg de prot.)	8,4	32,7

Tableau 5.

On y observe une nette différence entre ceux de branchies antérieures et postérieures. Néanmoins, ces résultats doivent être pris avec précaution étant donné les valeurs absolues relativement faibles des coefficients de corrélation linéaire (R) calculés via la transformation d'Eadie-Hofstee (fig. 7c) et celle de Lineweaver-Burk (fig. 7b) dans le cas des branchies antérieures.

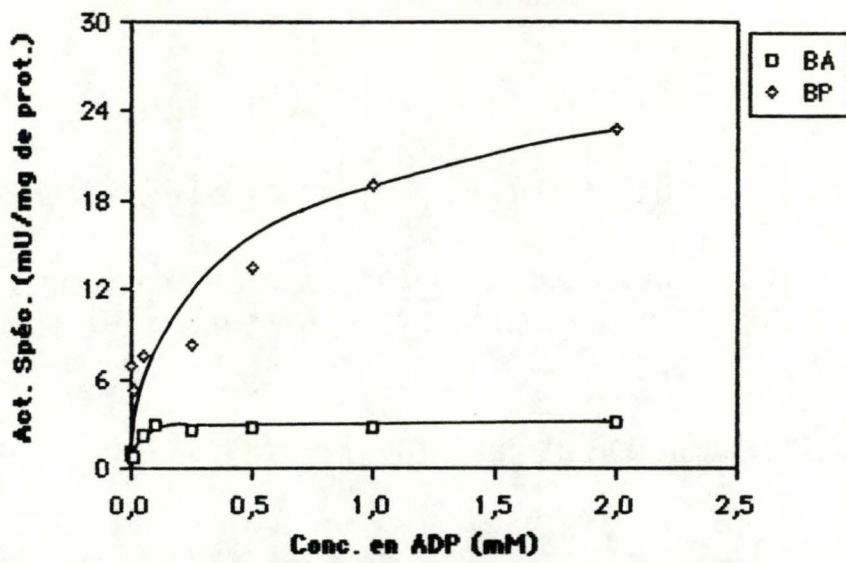


Fig. 10a: Effet de la concentration en ADP sur l'activité spécifique des PFK₁ branchiales

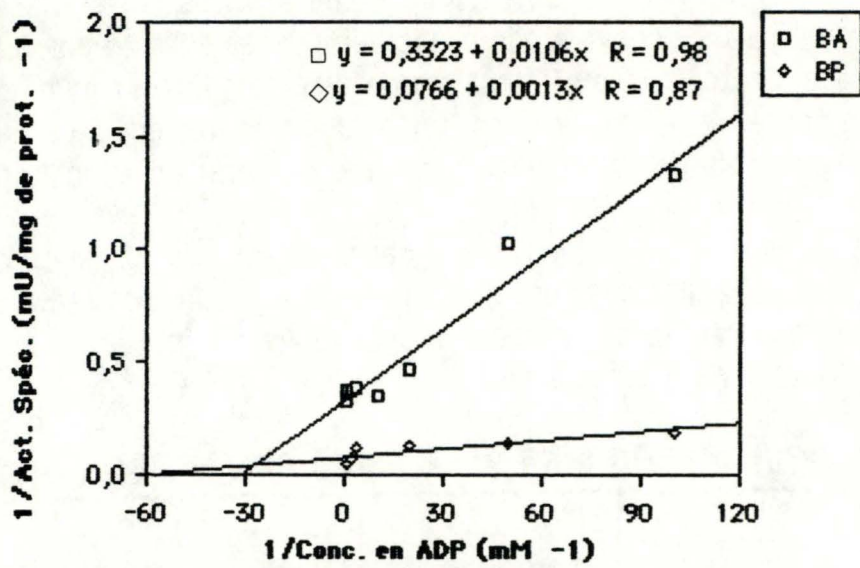


Fig. 10b: Transformation de Lineweaver-Burk pour l'ADP

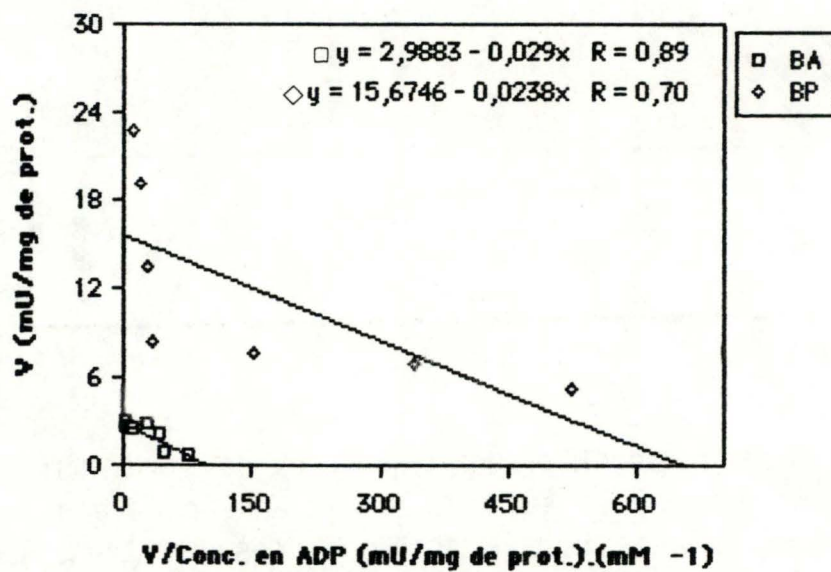


Fig. 10c: Transformation d'Eadie-Hofstee pour l'ADP

La concentration physiologique en AMP chez les mammifères et chez les invertébrés étant respectivement de l'ordre de 0,2 et de 0,05 mM [33,96], ces observations nous ont amené à suivre l'inhibition de l'ATP en présence d'une concentration 0,1 mM en AMP.

La figure 8 nous montre qu'à cette concentration, il stimule l'activité de l'enzyme et, ce, quelle que soit la concentration en ATP. Pour comprendre cette cinétique plus rapide qui s'exprime par une pente plus importante observée lors de l'ajout de 0,1 mM en AMP, il serait intéressant d'effectuer une étude cinétique plus poussée incluant, par exemple, des concentrations supérieures en AMP.

L'effet de l'AMP dépend aussi du pH. Ceci peut être visualisé sur les figures 9a et 9b. Quelle que soit la source d'enzyme utilisée (branchies antérieures ou postérieures), l'AMP n'a plus d'effet à pH 8,2. Ceci pourrait être expliqué par des modifications de charges réduisant sans doute la capacité de changements conformationnels que possède la PFK₁ et donc, son interaction possible avec différents effecteurs. D'autre part, une activité maximale est observée à ce pH. Ceci serait peut-être dû à une plus grande accessibilité des substrats au site actif. La conformation figée de la molécule en faciliterait donc l'accès, masquant l'effet de l'AMP.

B. L'ADP .

Comme l'AMP, l'ADP est activateur de l'enzyme des vertébrés. Nous observons un effet semblable à celui de l'autre nucléotide testé (point A), en présence d'ATP 3 mM et sans ajout d'AMP, pour les PFK₁ branchiales (fig. 10a). Les valeurs de K_a et de V_{max} (fig. 10b et 10c) sont reprises dans le tableau 6.

Valeurs moyennes des K_a et V_{max} pour l'ADP

	Br. Ant.	Br. Post.
K_a (mM)	0,031	0,021
V_{max} (mU/mg de prot.)	3,0	14,4

Tableau 6.

Tout comme pour l'AMP, il faut tenir compte des valeurs absolues relativement faibles des coefficients de corrélation linéaire (R) obtenus, ceci surtout dans le cas des branchies postérieures. La concentration en ADP dans les tissus animaux étant proche de 1 mM, qu'il s'agisse de vertébrés ou d'invertébrés, nous nous situons bien au dessus du K_a [33,96].

L'AMP et l'ADP sembleraient donc lever l'inhibition de l'ATP. Ceci est en accord avec les résultats obtenus pour d'autres tissus animaux [22,29,30].

1.4 Conclusions.

L'étude cinétique nous a permis d'identifier une activité phosphofructokinase dans les branchies antérieures et postérieures d'*Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce. Celle-ci est deux fois plus importante dans les branchies postérieures, ce qui est peut-être à mettre en rapport avec les différences ultrastructurales et fonctionnelles observées entre les deux types de branchies (voir point 3.1.3 de "introduction"). D'autre part, les différents composés adényliques qui expriment la charge énergétique ($[ATP] + 1/2 [ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$) semblent moduler effectivement l'activité de la PFK₁. Ainsi l'ATP, à des concentrations physiologiques, inhibe l'enzyme branchial tandis que l'AMP et l'ADP à des concentrations également rencontrées chez l'animal vivant, peuvent lever cette inhibition. L'action multimodulatrice de ces effecteurs doit donc intervenir dans l'adaptation à la salinité puisque la charge énergétique varie. Dès lors, des mesures de celle-ci chez le crabe permettront de voir si une telle corrélation existe effectivement chez *Eriocheir sinensis* [70,72].

L'insensibilité au citrate de l'enzyme branchial est un fait qui nous paraît très intéressant, étant donné qu'elle est également observée chez d'autres invertébrés tels la douve, *Fasciola hepatica*, la moule, *Mytilus edulis* et l'huître, *Crassostrea virginica* [25,26,97]. Il nous est permis de penser que les invertébrés n'ont pas acquis le signal "citrate" que possèdent les vertébrés. D'autres études pourraient en apporter la confirmation. L'existence, chez les invertébrés, d'un autre signal remplaçant celui de l'acide citrique peut être envisagée et recherchée parmi certains produits finaux tels l'alanine, l'acide lactique, ou le succinate (voir point 1.2.2 de "introduction").

Enfin, une régulation de l'enzyme branchial par le pH paraît plausible. De fait, des variations de la concentration en ions H⁺ modifient l'affinité de l'enzyme pour son substrat, le Fru-6-P et certains de ses effecteurs tels l'AMP et l'ATP. ont été observées chez plusieurs invertébrés tels la moule, *Mytilus edulis* [26]. Si de telles variations surviennent dans les branchies d'*Eriocheir sinensis*, l'activité de la PFK₁ pourrait en être modifiée.

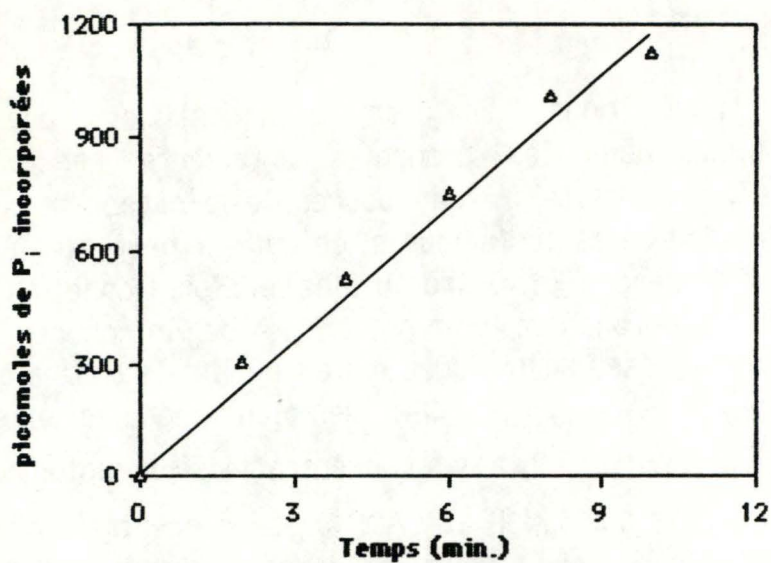


Fig. 11: Evolution au cours du temps de l'incorporation de P_i aux histones II- A

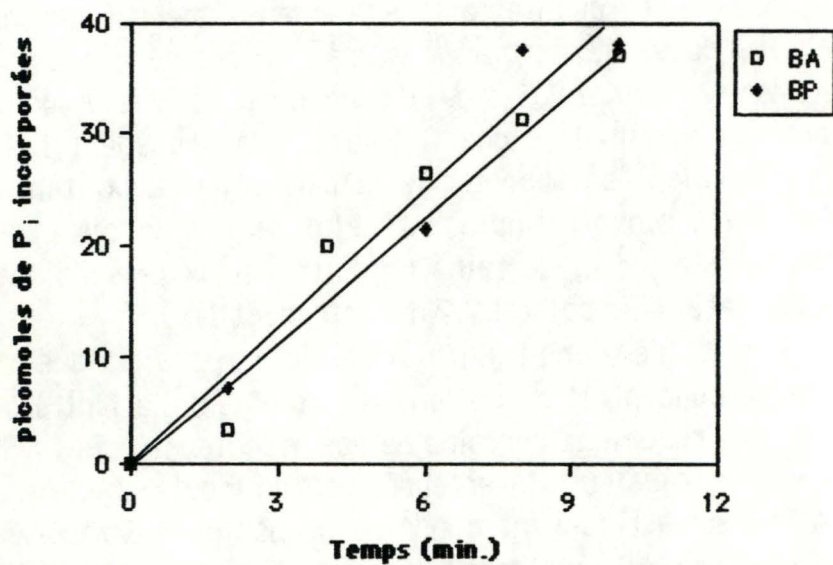


Fig. 12: Evolution au cours du temps de l'incorporation de P_i aux protéines de branchies

Chapitre 2 : Phosphorylation .

Les expériences présentées dans ce chapitre ont pour objectif de voir si une protéine kinase A (d'origine mammalienne) peut phosphoryler des protéines branchiales.

Parmi celles-ci, une attention particulière est portée aux protéines dont le PM se situe aux alentours de 80.000 , c'est-à-dire parmi celles susceptibles de correspondre à la PFK₁ de crabe.

Les conditions expérimentales de base (standard) sont décrites au point 6.1 de "matériel et méthodes". Lorsqu'il y a des modifications, elles sont mentionnées dans le texte.

2.1 Phosphorylation de protéines branchiales par une protéine kinase A mammalienne : approche quantitative.

La première étape consiste à vérifier que nos conditions expérimentales permettent l'incorporation de ³²P, à partir de [γ -³²P]-ATP, sur un système de référence accepteur de PO₄³⁻, à savoir les histones de type II-A.

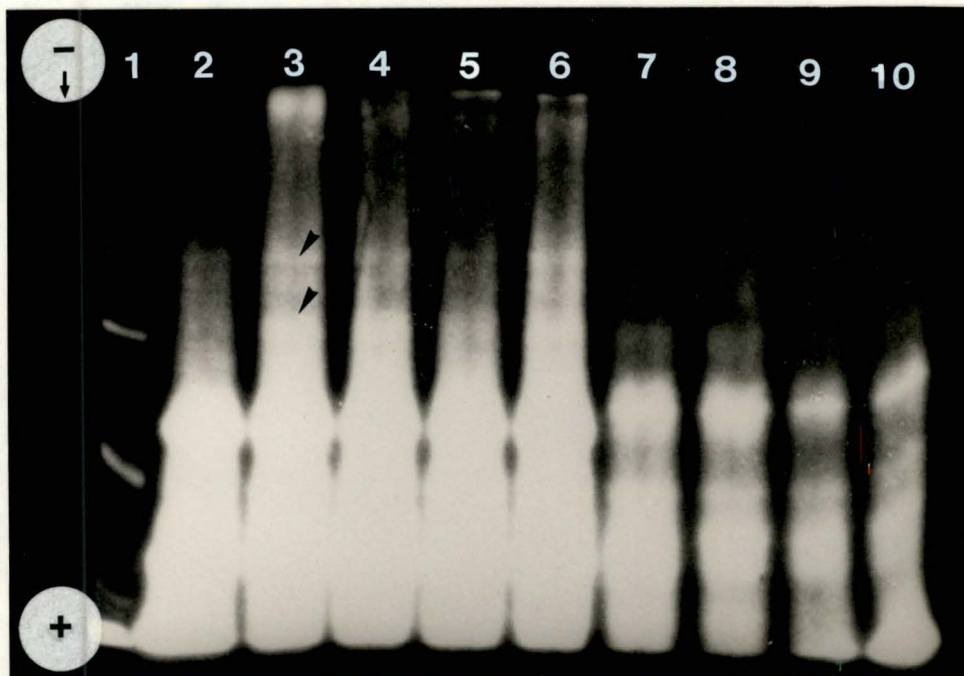
Deux contrôles sont effectués : l'autophosphorylation de la protéine kinase A qui est mesurée dans le milieu dépourvu de substrat et l'adsorption aspécifique qui est mesurée dans le milieu dépourvu de l'enzyme phosphorylante exogène. Comme nous le mentionnons au point 6.1 de "matériel et méthodes", les protéines kinases endogènes ont été inactivées par plusieurs cycles de "congélation-décongélation" de l'échantillon.

Les valeurs obtenues pour l'autophosphorylation, y incluse l'adsorption aspécifique, sont soustraites de celles de chaque test afin d'obtenir l'incorporation réelle, soit celle qui est due à l'activité de la protéine kinase exogène.

La figure 11 représente la quantité de P_i incorporée par la protéine kinase exogène, aux histones de type II-A pendant une période de 10 minutes, en présence de AMPc.

Après avoir vérifié la fonctionnalité de ce système de référence, la phosphorylation des protéines branchiales (antérieures et postérieures) est effectuée dans ces mêmes conditions. Nous observons à la figure 12 une incorporation de P_i sur les protéines branchiales, linéaire dans le temps entre 0 et 10 minutes et ce, quel que soit le type de branchies.

Ce test quantitatif nous permet de conclure à l'existence dans les deux types de branchies de protéines phosphorylables par une protéine kinase A d'origine mammalienne.



Photographie 1: * + autoradiographie

Piste 1: Etalons Amersham

Piste 2: Protéine kinase A = 100 µg - autophosphorylation

Piste 3: (BP + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation dépourvu de KF

Piste 4: (BP + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation dépourvu de KF

Piste 5: (BA + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation dépourvu de KF

Piste 6: (BA + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation dépourvu de KF

Piste 7: (BP + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation contenant du KF 20 mM

Piste 8: (BP + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation contenant du KF 20 mM

Piste 9: (BA + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation contenant du KF 20 mM

Piste 10: (BA + protéine kinase A) = 100 µg - milieu d'homogénéisation contenant du KF 20 mM

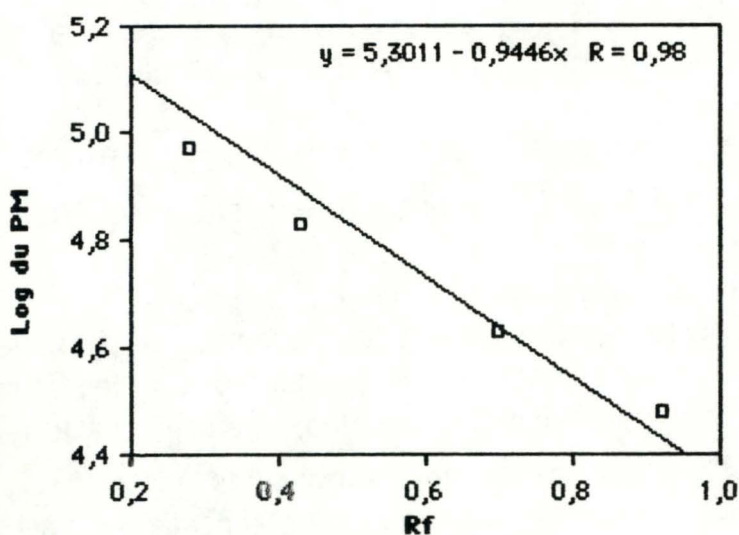
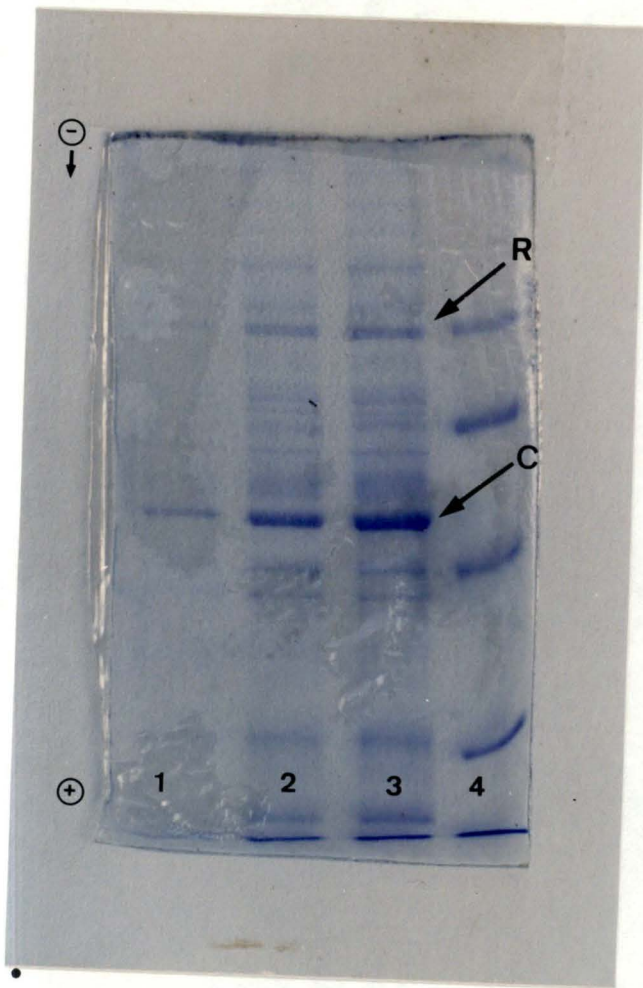


Fig. 13: Droite d'étalonnage pour la photographie 1



* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot

Photographie 2: *

Piste 1: Protéine kinase 1 μg
 Piste 2: Protéine kinase 2,5 μg
 Piste 3: Protéine kinase 5 μg
 Piste 4: Etalons Pharmacia

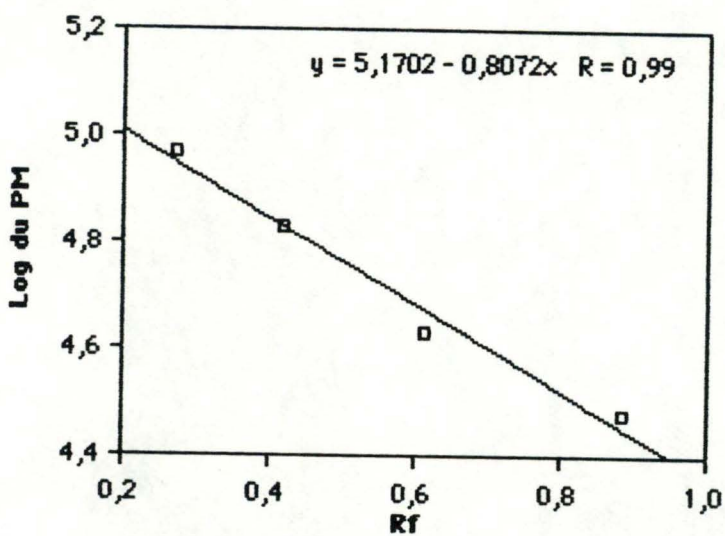


Fig. 14: droite d'étalonnage pour le pattern électrophorétique de la photographie 2

2.2 Analyse qualitative des protéines phosphorylées.

Pour analyser qualitativement les protéines branchiales phosphorylées par la protéine kinase A de coeur de bœuf, nous utilisons la technique d'autoradiographie de gel d'électrophorèse. La séparation des protéines sur gel SDS-PAGE 10 % est effectuée en milieu réducteur sur des échantillons traités au TCA 10 % afin d'éliminer le [γ - 32 P] ATP excédentaire (voir point 3.3 de "Matériel et méthodes").

Nous analysons ci-contre un pattern d'autoradiographie obtenu après phosphorylation de protéines branchiales préparées dans deux conditions différentes. Pour chaque piste, nous déposons 100 μ g de protéines. Après électrophorèse, le gel est mis en contact avec une plaque photographique pendant \pm 72 heures (photographie 1).

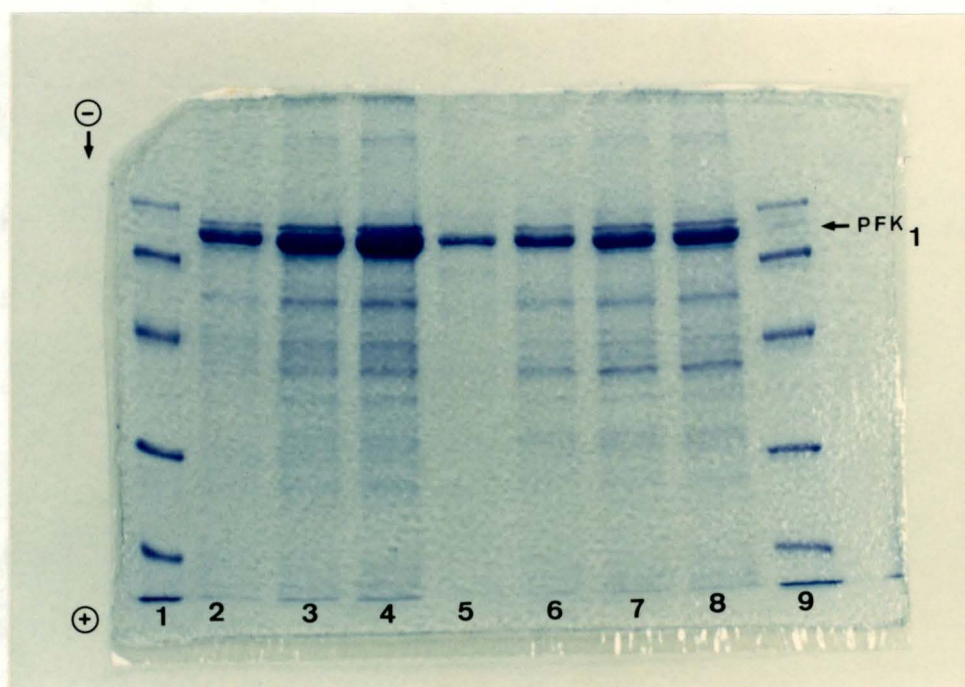
Il ressort de cette expérience qu'une incorporation de P_i aux protéines branchiales s'observe en présence ou en absence de KF dans le milieu d'homogénéisation et ce, pour les deux tissus. L'intensité de l'incorporation est beaucoup plus faible lorsque les protéines sont extraites en présence de fluorure, inhibiteur de phosphatases. Dans ce cas, ces enzymes endogènes étant inactifs, certains sites de phosphorylation n'ont pas pu être libérés, d'où une réduction de l'incorporation de P_i aux protéines. Nous n'observons aucune différence significative entre branchies postérieures et antérieures.

Ce qui est essentiel ici, c'est de comparer les différentes pistes à celle qui correspond à l'autophosphorylation de la protéine kinase A. Peu de différences s'observent en fait, sauf au niveau des protéines dont le PM est proche de 80.000. A cet endroit, deux bandes protéiques ont retenu notre attention. La première dont le R_f est de 0,30, correspond si on se réfère à la figure 13, à un PM de \pm 99.000. La seconde, moins marquée, dont le R_f est de 0,42, correspond à un PM de \pm 80.000.

*** Protéine de \pm 99.000 .**

Cette bande protéique apparaît aussi bien dans les pistes correspondant aux protéines branchiales que dans celle de l'autophosphorylation. Comme la protéine kinase A est capable d'autophosphoryler sa sous-unité régulatrice, nous avons cherché à visualiser sa localisation sur le même type de gel que celui utilisé pour l'autoradiographie mais coloré cette fois au Bleu de Coomassie.

Deux bandes d'intensité plus forte apparaissent sur la photographie 2. La première de PM \pm égal à 93.000 correspond sans doute à la sous-unité R de la protéine kinase A (fig. 14). Elle serait, sans que nous puissions l'affirmer,



Photographie 3: *

- Piste 1: Etalons Pharmacia
- Piste 2: BA 5 µg
- Piste 3: BA 10 µg
- Piste 4: BA 20 µg
- Piste 5: PFK du muscle 0,5 µg
- Piste 6: BP 5µg
- Piste 7: BP 10 µg
- Piste 8: BP 10 µg
- Piste 9: Etalons Pharmacia

* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot

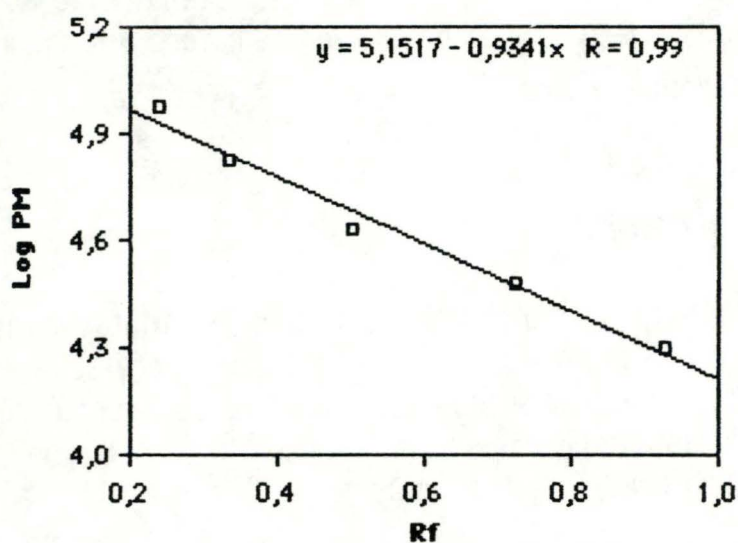


Fig. 15: Droite d'étalonnage pour le pattern électrophorétique pour la photographie 3

l'équivalent de la bande de 99.000 observée en autoradiographie. En effet, la variabilité, même réduite, qui est liée aux migrations individuelles en est la cause. C'est elle qui entraîne de petites différences dans l'estimation des PM de protéines.

La seconde bande qui nous intéresse correspond à une protéine de ± 54.000 . Elle représente, sans doute, la sous-unité C de la protéine kinase A.

*** Protéine de ± 80.000 .**

Comme cette bande est absente du pattern de l'autophosphorylation, il s'agit vraisemblablement d'une protéine branchiale. Nous avons vérifié par une exposition plus longue du film (10 jours) que son absence dans ce pattern n'était pas liée à sa faible intensité.

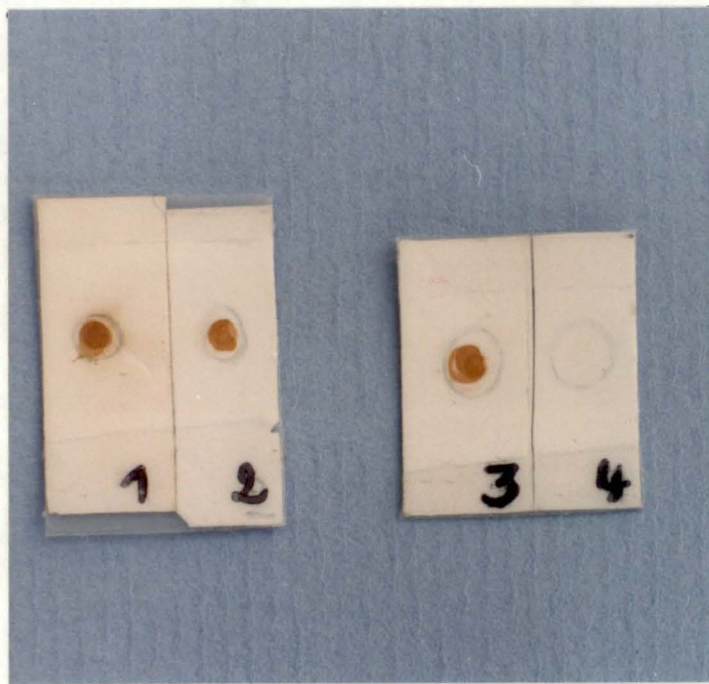
L'analyse d'un pattern électrophorétique de protéines branchiales et de PFK_M mammalienne, réalisée dans des conditions analogues à celles de l'autoradiographie mais coloré au Bleu de Coomassie nous apporte des informations sur son identité (photographie 3)

Nous avons estimé par la régression linéaire présentée à la figure 15, le PM de la PFK_M mammalienne à ± 77.000 . Une bande protéique ayant un PM identique s'observe sur le pattern des protéines branchiales (pistes 2,3,4,,6,7 et 8).

2.3 Conclusions.

Dans les profils électrophorétiques qui ont été présentés, l'estimation des PM est entâchée d'une variabilité qui laisse une incertitude dans l'identification des différentes protéines.

Si tel est le cas pour la bande qui apparaît sur l'autoradiographie à ± 80.000 , elle pourrait représenter la PFK₁ (dont le PM a été estimé à ± 77.000 sur la photographie 3). Pour nous en assurer, nous allons recourir à d'autres techniques qui mettent en œuvre une approche immunologique.



Sérum Préimmun
Sérum immun
* gel SDS-PAGE
◇ Dot-blot
□ Immunoblot

Photographie 4: ◇

Piste 1: PFK du muscle 100 ng - Dil. 1000 X (rat PFK 1mg)
 Piste 2: PFK du muscle 100 ng - Dil. 1000 X (rat PFK 0,5 mg)
 Piste 3: PFK du muscle 100 ng - Dil. 1000 X (rat PFK 0,25 mg)
 Piste 4: PFK du muscle 100 ng - Dil. 1000 X

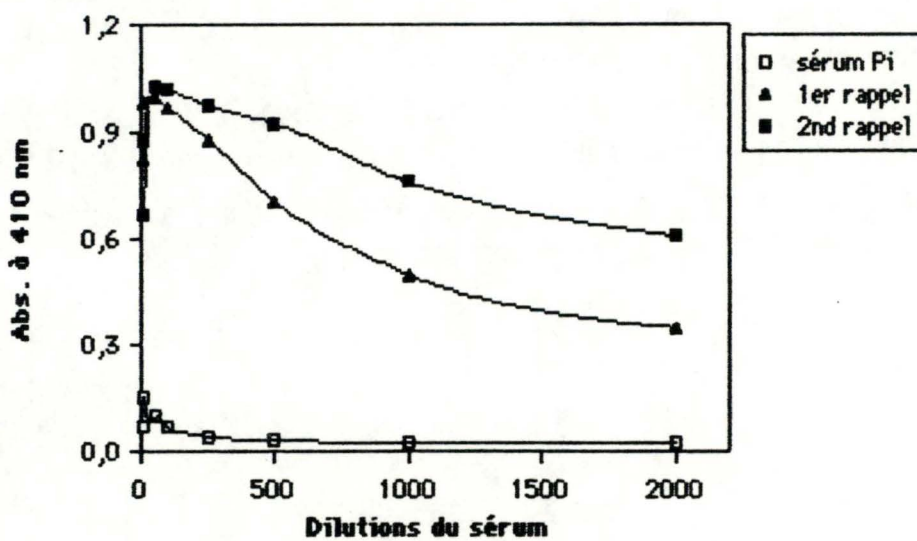


Fig. 16: Spécificité des polyséras du rat immun (PFK_D 0,5 mg) vis-à-vis de la PFK_M

Chapitre 3 : Sonde immunologique.

Le but des expériences présentées dans ce chapitre est de mettre au point un outil permettant de savoir si la protéine phosphorylable de ± 80.000 (photographie 1) correspond effectivement à la PFK₁. Toutes les techniques utilisées sont reprises dans "Matériel et méthodes".

3.1 Détection d'anticorps anti-PFK_M de lapin.

Nous avons injecté des rats avec de la PFK_M purifiée à partir du muscle de lapin. Afin de vérifier la présence d'Ac anti-PFK_M (= Ac₁) dans le sérum de ces rats, nous utilisons les techniques du Dot-blot et de l'ELISA sur l'Ag spécifique purifié.

3.1.1 Analyse qualitative par Dot-blot des Ac éventuellement produits.

Le Dot-blot est une technique permettant de s'assurer de la présence d'Ac anti-PFK_M dans le sérum des rats (1, 0,5 et 0,25 mg) (photographie 4). A une dilution 1/1.000, le sérum d'un rat-contrôle ne reconnaît pas l'Ag purifié (piste 4) tandis que les trois séras de rats traités à la PFK_M (1, 0,5 et 0,25) le reconnaissent (pistes 1, 2 et 3 respectivement). Il y a donc bien une réaction Ag-Ac.

3.1.2 Analyse quantitative des Ac.

Le test ELISA constitue une analyse quantitative. Il a été effectué sur le sérum d'un rat traité à la PFK_M (0,5 mg) et celui d'un rat-contrôle. Les résultats sont présentés à la figure 16. Le sérum du rat immunisé contient des Ac dirigés contre la PFK_M. Le titre qui équivaut à la dilution du sérum donnant encore la moitié de la réponse maximale observée, augmente avec le nombre de rappels. Après le premier, il correspond à la dilution 1.000 tandis qu'on obtient une réponse plus forte après le second : le titre est en effet bien supérieur à la dilution 2.000. Aux faibles dilutions (50 X et moins), on constate une augmentation abrupte des valeurs de l'absorbance (410 nm) vers un point maximum. Ceci s'expliquerait par un "encombrement stérique" : à ces dilutions, les Ac très nombreux par rapport aux Ag se gêneraient mutuellement pour l'occupation de tel ou tel épitope.

Les deux tests réalisés nous persuadent de la présence d'Ac dirigés contre la PFK_M dans le sérum des rats traités.

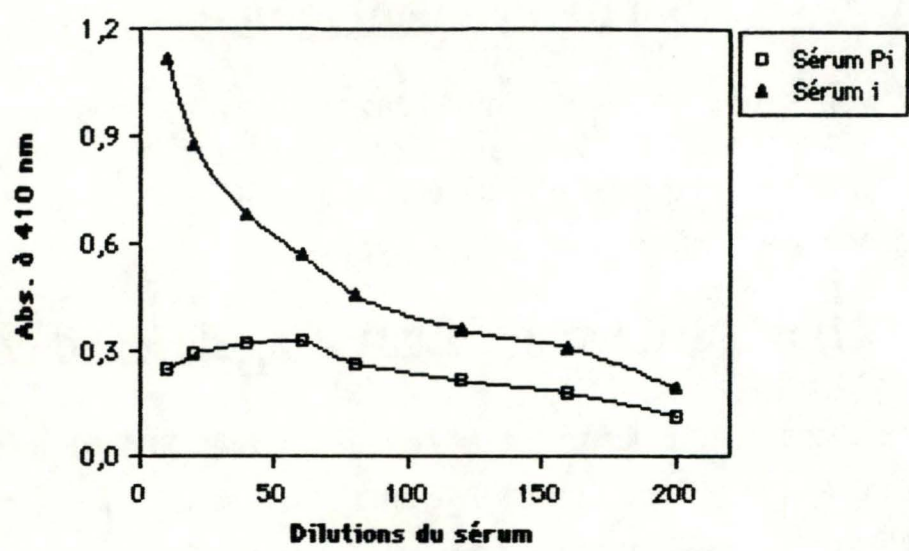


Fig. 17: Spécificité du polysérum du rat (PFK_M 0,5 mg) vis-à-vis des protéines branchiales (BA)

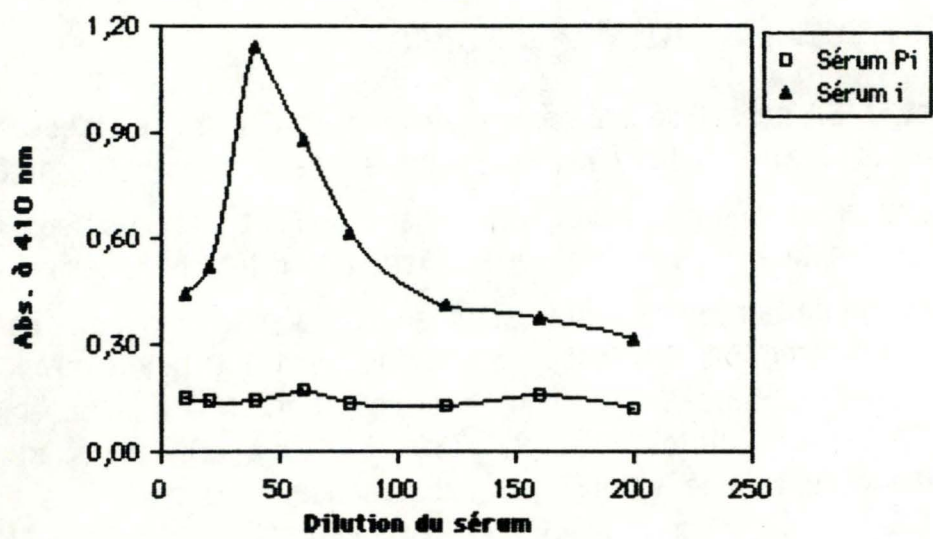
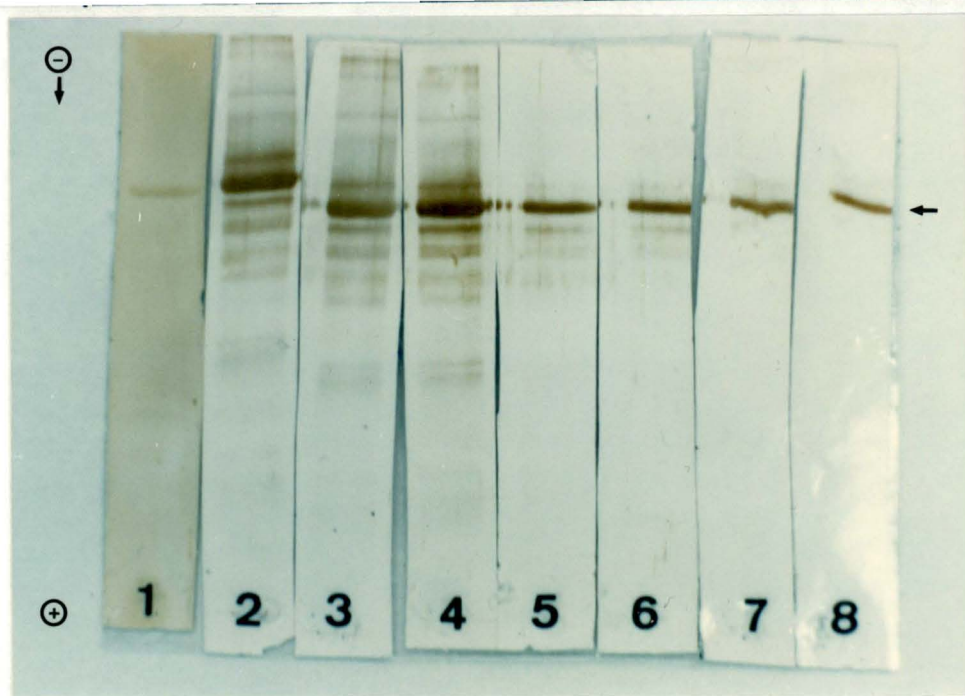
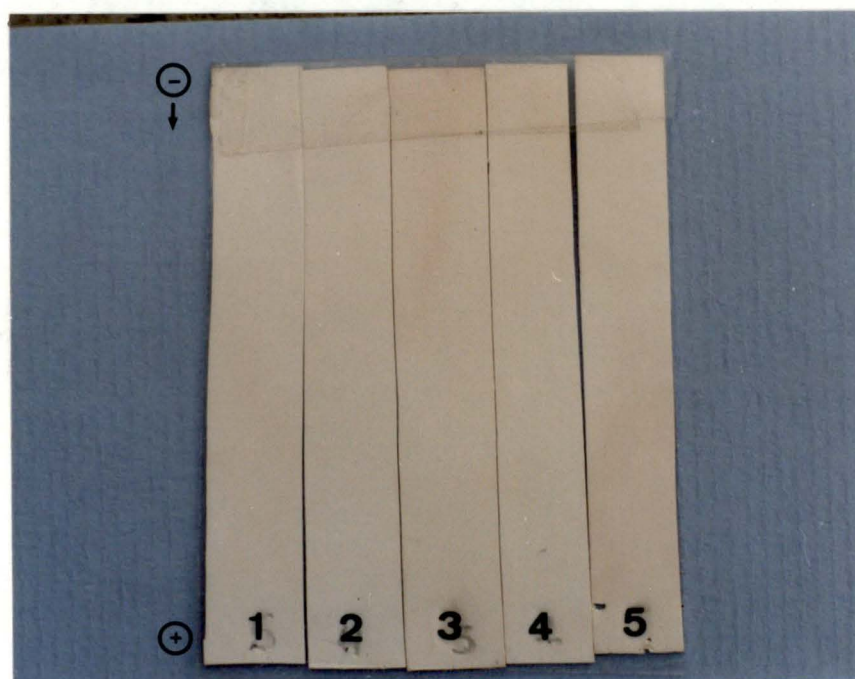


Fig. 18: Spécificité du polysérum du rat (PFK_M 1 mg) vis-à-vis des protéines branchiales (BP)



Photographie 5: □

- Piste 1: PFK du muscle 1 μ g - Dil. 2000 X
- Piste 2: PFK du muscle 1 μ g - Dil. 2000 X (rat PFK 1mg)
- Piste 3: Idem piste 2
- Piste 4: Idem piste 2
- Piste 5: PFK du muscle 0,1 μ g - Dil. 2000 X (rat PFK 1mg)
- Piste 6: Idem piste 5
- Piste 7: PFK du muscle 0,05 μ g - Dil. 2000 X (rat PFK 1mg)
- Piste 8: idem piste 7



Photographie 6: □

- Piste 1: BP 2 μ g
- Piste 2: BP 0,5 μ g
- Piste 3: BA 2 μ g
- Piste 4: BA 0,5 μ g
- Piste 5: PFK du muscle 2 μ g

Pas d'anticorps 1 !

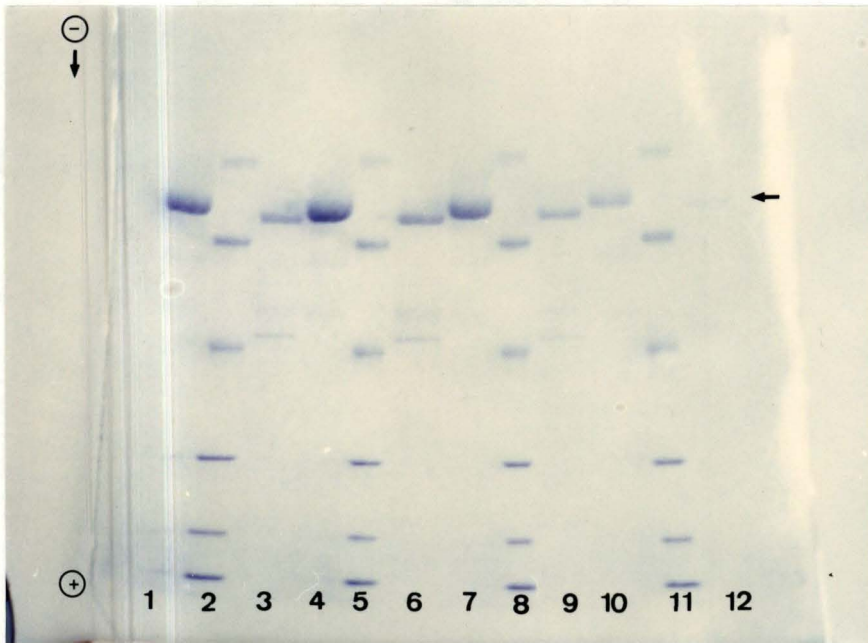
Sérum Préimmun
Sérum immun

- * gel SDS-PAGE
- ◇ Dot-blot
- Immunoblot

* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot



Photographie 7: *

- Piste 1: PFK du muscle 10 µg
- Piste 2: Etalons Pharmacia
- Piste 3: PFK du foie 10 µg
- Piste 4: PFK du muscle 10 µg
- Piste 5: Etalons Pharmacia
- Piste 6: PFK de foie 10 µg
- Piste 7: PFK du muscle 5 µg
- Piste 8: Etalons Pharmacia
- Piste 9: PFK du foie 5 µg
- Piste 10: PFK du muscle 1 µg
- Piste 11: Etalons Pharmacia
- Piste 12: PFK du foie 1 µg

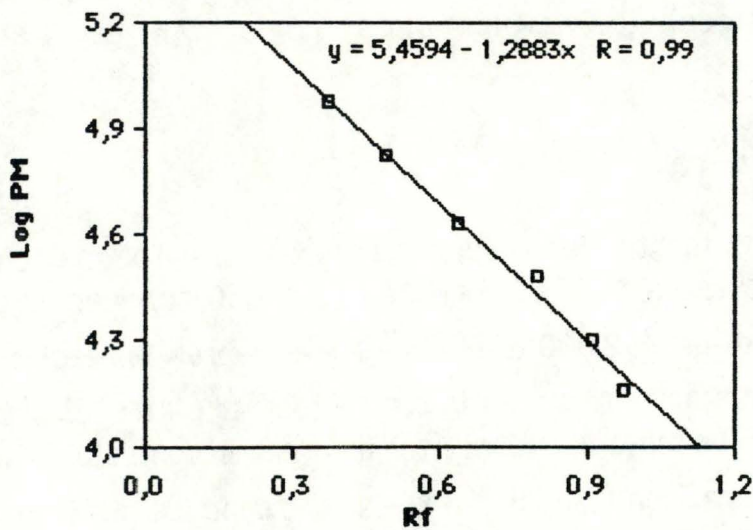


Fig. 19: droite d'étalonnage pour le pattern électrophorétique de la photographie 7

3.2 "Comportement" de ces Ac en présence de protéines branchiales.

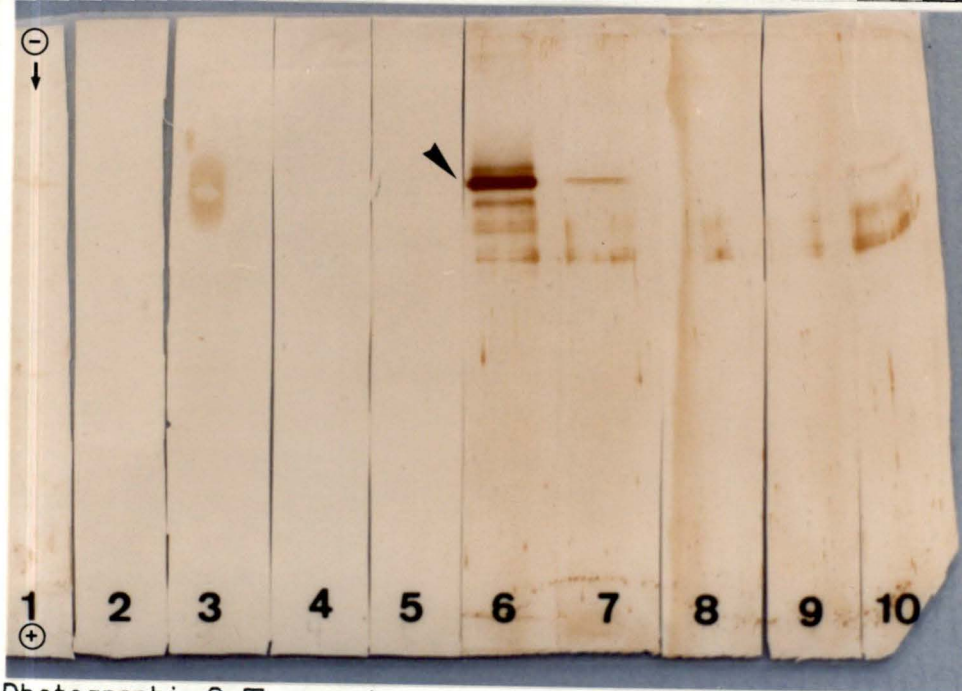
Le but de notre travail étant d'obtenir une sonde pour identifier la PFK₁ branchiale d'*Eriocheir sinensis*, nous avons décidé de tester le sérum comprenant les Ac anti-PFK_M sur un extrait de branchies antérieures et postérieures par la méthode ELISA. Les résultats de cette expérience sont montrés aux figures 17 et 18. Quel que soit le type de branchie, on obtient une réponse positive au sérum des rats "PFK_M 1 mg" pour les branchies postérieures et "PFK_M 0,5 mg" pour les branchies antérieures). Le sérum des rats-contrôle ne donne qu'une réponse minimale et constante quelle que soit la dilution. D'autre part, l'encombrement stérique expliquerait ici encore l'augmentation abrupte des valeurs d'absorbance (410 nm) aux faibles dilutions du sérum. En conclusion, on peut dire que ces Ac reconnaissent une ou plusieurs protéines branchiales dont fait peut-être partie la PFK₁. Celles-ci vont être caractérisées dans le point suivant.

3.3 Examen des protéines reconnues par l'Ac au moyen de l'immunoblot.

L'immunoblot est un autre moyen d'analyse qualitative qui se réalise sur un pattern de protéines soumises à une électrophorèse SDS-PAGE (gel 10%) et transférées sur nitrocellulose (voir points 7.3 et 7.4 de "Matériel et méthodes").

3.3.1 Sur la PFK_M.

La photographie 5 montre les résultats obtenus lorsqu'on met en contact des quantités décroissantes de PFK_M purifiée (1 µg à 50 ng) avec du sérum de rat "PFK_M 1 mg" à la dilution 2.000 (pistes de 2 à 8). Après la réaction Ag-Ac, une bande protéique majoritaire apparaît sur toutes les pistes; il s'agit de la PFK₁ (PM = ± 77.000). La piste n° 1 constitue un premier contrôle. Dans ce cas, le sérum provient d'un rat non immunisé (Pi). Ce sont donc les différences entre cette réponse aspécifique et celle obtenue avec du sérum de rat immun qui indiqueront s'il y a réellement reconnaissance d'un antigène par l'Ac. Notons ici qu'un autre contrôle est à effectuer . Il s'agit d'omettre l'Ac (remplacé par du tampon PBS) afin de détecter une réaction éventuelle des Ac anti-immunoglobulines de rat couplés à la peroxydase (=Ac 2) avec l'antigène. La photographie 6 reprend ces contrôles effectués en même temps que le test

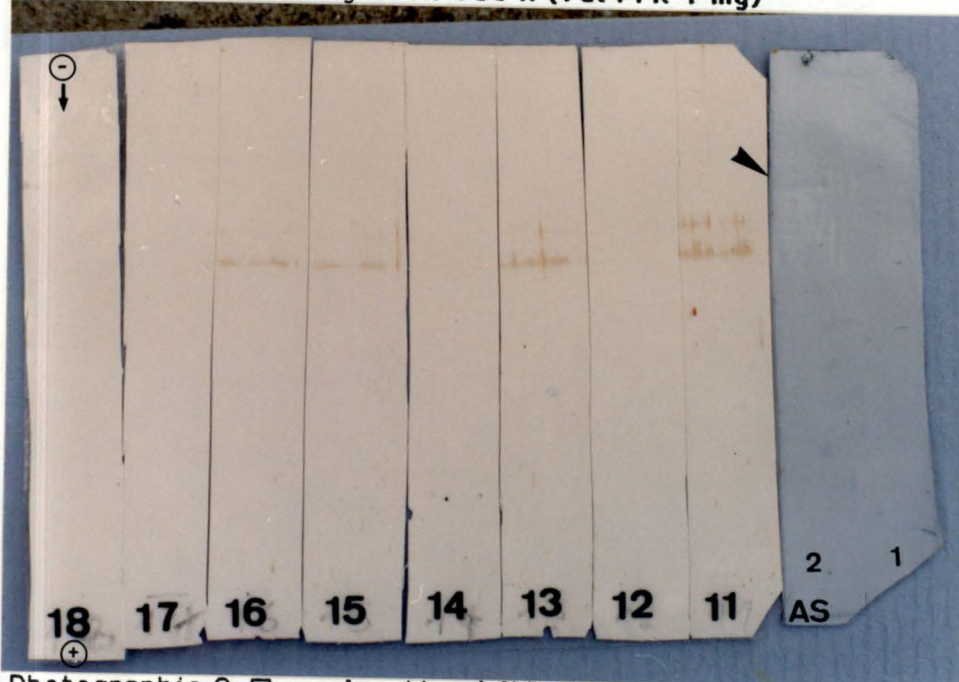


Photographie 8: □

- Piste 1: PFK du muscle 100 ng - Dil. 750 X
- Piste 2: BA 100 ng - Dil. 750 X
- Piste 3: BA 50 ng - Dil. 750 X
- Piste 4: BP 50 ng - Dil. 750 X
- Piste 5: PFK du foie 100 ng - Dil. 750 X
- Piste 6: PFK du muscle 100 ng - Dil. 750 X (rat PFK 1mg)
- Piste 7: BA 100 ng - Dil. 750 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 8: BA 50 ng - Dil. 750 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 9: BP 50 ng - Dil. 750 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 10: PFK du foie 100 ng - Dil. 750 X (rat PFK 1 mg)

Sérum Préimmun
Sérum immun

- | |
|----------------|
| * gel SDS-PAGE |
| ◇ Dot-blot |
| □ Immunoblot |



Photographie 9: □ + coloration à l'Amidoschwarz (AS)

- AS 1: BA 0,5 µg
- AS 2: BA 2 µg
- Piste 11: BP 2 µg - Dil. 2500 X (rat PFK 1mg)
- Piste 12: BP 2 µg - Dil. 2500 X
- Piste 13: BA 2 µg - Dil. 2500 X (rat PFK 1mg)
- Piste 14: BA 2 µg - Dil. 2500 X
- Piste 15: BP 1 µg - Dil. 2500 X (rat PFK 1mg)
- Piste 16: BP 0,5 µg - Dil. 2500 X (rat PFK 1mg)
- Piste 17: BA 1 µg - Dil. 2500 X
- Piste 18: BP 0,5 µg - Dil. 2500 X

sur différentes protéines, soit de la PFK_M 1 µg (piste 5) , soit des protéines des deux types de branchies (antérieures et postérieures) 2 µg et 0,5 µg. Comme aucune réaction n'est observée quelle que soit l'origine (lapin ou crabe)des protéines présentes sur la nitrocellulose et pour des quantités de protéines importantes, ces contrôles ne seront plus réalisés par la suite. Revenons quelque peu sur les résultats repris sur la photographie 5. Outre la PFK_M, d'autres protéines sont reconnues par les anticorps. Ces bandes "parasites" disparaissent progressivement lorsqu'on réduit la quantité de protéines blottées et tendent même à disparaître à l'exception d'une seule située juste au-dessus de la PFK_M. L'examen d'un pattern électrophorétique de la PFK_M de muscle de lapin va nous aider à comprendre les résultats observés en immunoblot. Sur les photographies 7 et 10, outre la différence de PM (calculé au moyen de la droite d'étalonnage reprise à la figure 19) entre la PFK_M et la PFK_L, on observe des contaminants qui interfèrent avec le schéma expérimental notamment aux alentours de 50.000 . Puisque les rats ont été injectés avec une mosaïque protéique, nous obtenons, comme visualisé sur les immunoblots, un sérum polyclonal reconnaissant la PFK_M et certains de ses contaminants.

3.3.2 Sur les protéines branchiales.

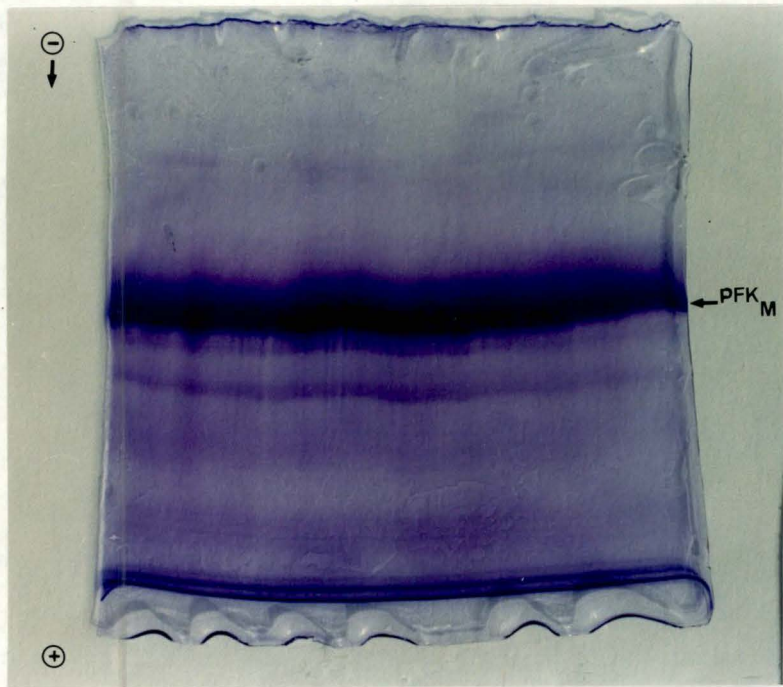
Des immunoblots réalisés sur des protéines de branchies antérieures et postérieures sont présentés sur les photographies 8 et 9.

* On constate que tous les tests révélés avec du sérum de rat non-immunisé (Pi) sont négatifs (pistes de 1 à 5 et 12, 14, 17 et 18). La faible intensité observée lorsqu'il s'agit de l'Ag spécifique (piste 1) ne nous gêne pas car il existe une nette différence d'intensité avec le test du sérum immun (piste 6), toutes conditions étant égales.

* On voit également que les Ac anti-PFK_M reconnaissent la PFK_L du foie de lapin (piste 10). Toutefois, dans ce cas, la réponse est moins intense alors qu'il s'agit de la même quantité de protéines blottées et d'une même dilution du sérum.

* En ce qui concerne les résultats obtenus sur 100 ng de protéines branchiales, nous observons pour les branchies antérieures une double bande de PM de ± 77.000 (piste 7). Etant donné son PM proche de celui de l'enzyme mammalien et sa réactivité avec l'Ac₁, nous pouvons penser qu'il s'agit de la PFK₁ branchiale. Le dédoublement de la bande pourrait peut-être refléter l'existence de deux sous-unités de PM sensiblement différents.

Il faut cependant être prudent dans l'interprétation car il est évident que le sérum contient des Ac dirigés contre d'autres protéines. D'ailleurs, on retrouve



Sérum Préimmun
Sérum immun

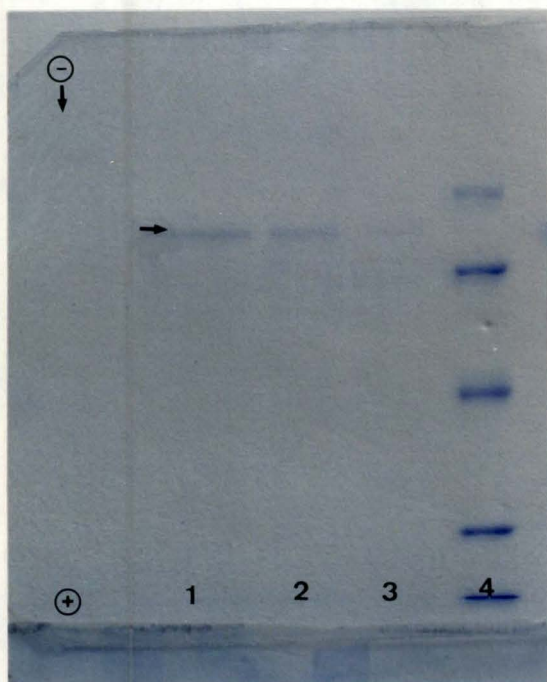
* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot

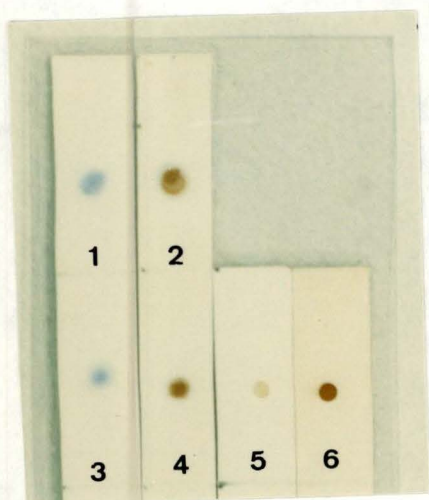
Photographie 10: *

PFK du muscle 3 mg.



Photographie 11: *

Piste 1: PFK du muscle électro-éluée $\pm 2 \mu\text{g}$
 Piste 2: PFK du muscle électro-éluée $\pm 1 \mu\text{g}$
 Piste 3: PFK du muscle électro-éluée $\pm 0,5 \mu\text{g}$
 Piste 4: Etalons Pharmacia



Photographie 12: ◇

Piste 1: PFK du muscle électro-éluée $2 \mu\text{g}$ - Dil. 500 X
 Piste 2: PFK du muscle électro-éluée $2 \mu\text{g}$ - Dil. 500 X (rat PFK 1mg)
 Piste 3: PFK du muscle électro-éluée $1 \mu\text{g}$ - Dil. 500 X
 Piste 4: PFK du muscle électro-éluée $1 \mu\text{g}$ - Dil. 500 X (rat PFK 1mg)
 Piste 5: PFK du muscle $1 \mu\text{g}$ - Dil. 500 X
 Piste 6: PFK du muscle $1 \mu\text{g}$ - Dil. 500 X (rat PFK 1 mg)

ici les mêmes bandes "ubiquistes" déjà observées sur la photographie 5 et dont le PM est compris entre 43.000 et 67.000 . De plus, si on diminue fortement les deux paramètres protéiques (protéines blottées et sérum contenant les Ac) , seules ces bandes restent reconnues. Comparons-les maintenant aux protéines branchiales colorées à l'Amidoschwarz (photographie 9 - pistes AS 1 & 2). Seules sont visibles trois bandes de PM de ± 80.000 dont au moins une si pas deux semblent correspondre à la PFK₁.

Finalement, la bande de ± 50.000 persistant aux fortes dilutions du sérum pourrait être soit de la PFK₁ altérée, soit une protéine commune au crabe et au lapin contre laquelle les rats auraient produit des anticorps vu l'hétérogénéité de la source de PFK₁ injectée (photographies 7 et 10).

Si la seconde alternative se vérifie, il est essentiel d'éliminer ces contaminants afin d'obtenir un sérum monospécifique dirigé uniquement contre la PFK_M pour l'identification d'une PFK₁ branchiale.

3.4 Production d'anticorps monospécifiques à partir du sérum préexistant.

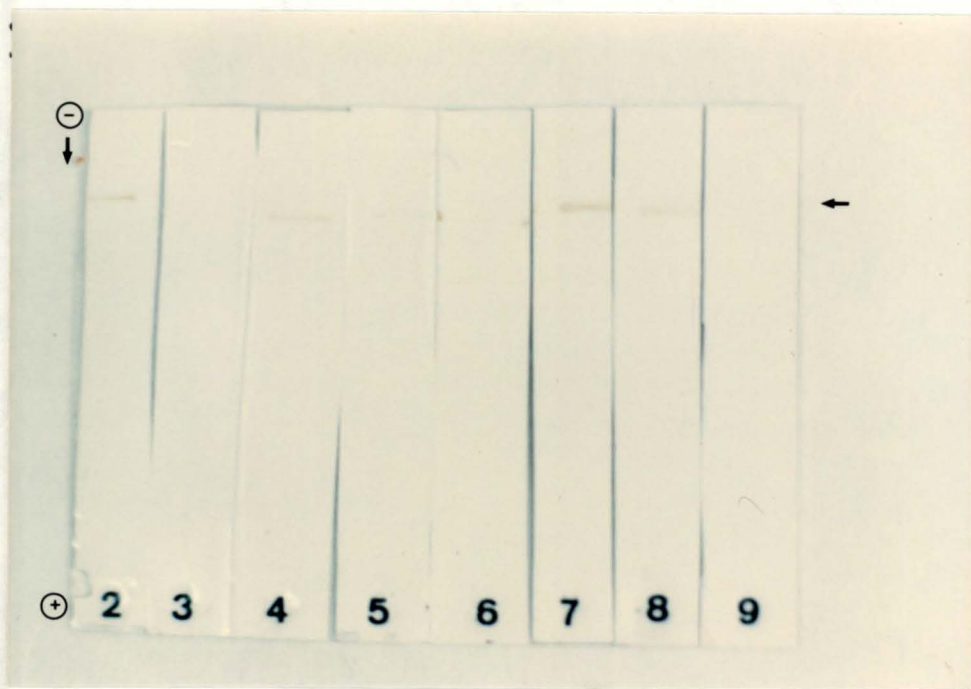
Pour obtenir un sérum monospécifique, nous allons procéder comme suit: par la technique d'électro-élution de protéines à partir d'un gel préparatif de polyacrylamide fixé et coloré au Bleu de Coomassie (photographie 10), nous allons "purifier" la PFK_M. Cette protéine sera alors greffée sur un gel d'affinité préalablement activé au CNBr et, finalement, après passage des polyséras sur une colonne chargée avec celui-ci, nous récupérerons des Ac spécifiques de la PFK_M.

3.4.1 Visualisation du degré de purification de la PFK_M après électro-élution.

Comme le montre la photographie 11, un échantillon de PFK_M électro-élué donne en SDS-PAGE 10 % une seule bande de ± 77.000 .

3.4.2 Vérification par Dot-blot de la reconnaissance par l'anticorps de la PFK_M électro-éluée .

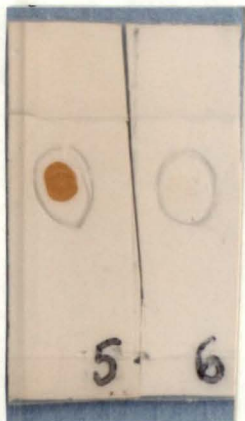
La photographie 12 montre qu'il y a bien une réaction entre cette protéine, fixée et colorée, et l'Ac (piste 2), comparable à celle observée avec la PFK_M purifiée non traitée (piste 4). Quant au sérum du rat non immunisé (P1), il ne produit aucune réaction quel que soit le type d'Ag testé (piste 1).



Sérum Préimmun
Sérum immun
* gel SDS-PAGE
◇ Dot-blot
□ Immunoblot

Photographie 13: □

- Piste 2: PFK du muscle 0,05 μg - Dil. 400 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 3: PFK du muscle 0,05 μg - Dil. 400 X
- Piste 4: PFK du muscle 0,1 μg - Dil. 400 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 5: PFK du muscle 0,1 μg - Dil. 1000 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 6: PFK du muscle 0,5 μg - Dil. 400 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 7: PFK du muscle 0,5 μg - Dil. 1000 X (rat PFK 1 mg)
- Piste 8: PFK du muscle 1 μg - Dil. 1200 X (rat PFK 1mg)
- Piste 9: PFK du muscle 1 μg - Dil. 400 X



Photographie 14: ◇

- Piste 5: PFK du muscle 100 ng - Dil. 500 X (rat X 1 mg)
- Piste 6: PFK du muscle 100 ng - Dil. 500 X

3.4.3 Greffage de la protéine sur un gel d'affinité.

La PFK_M électro-éluée est greffée sur un gel d'affinité (sépharose-4B activé au CNBr). Les séra, qu'ils soient immuns ou préimmuns sont passés sur une colonne contenant ce gel d'affinité. Tous les constituants n'étant pas accrochés sont éliminés et les anticorps sont élués par changement de pH (voir point 7.6 de "Matériel et méthodes").

3.4.4 Examen de la fraction éluee à partir du gel d'affinité.

La photographie 13 illustre les résultats obtenus selon la technique d'immunoblot, lorsqu'on met en contact un sérum traité par le gel d'affinité et la PFK_M. Quelle que soit la quantité de PFK_M présente sur la nitrocellulose (de 50 ng à 1 µg), le sérum "purifié" dilué 400 fois donne une réponse positive. La piste 6 donne toutefois un résultat inattendu qu'il faut peut-être attribuer à une erreur expérimentale. Sur la piste 5, on peut s'apercevoir que 100 ng de PFK_M sont détectés par le sérum 1/1.000.

Sur la piste 9, 1 µg de PFK_M mise en présence de sérum Pi de rat, éluee également sur une colonne d'affinité, ne donne aucun signal.

Ce résultat positif obtenu avec des anticorps "purifiés" au moyen du gel d'affinité est le seul que nous ayons obtenu. La difficulté majeure dans ce système expérimental est le rendement quasiment nul de la colonne d'affinité à mettre en rapport avec la faible quantité d'anticorps récupérée. D'autre part, un phénomène particulier est observé lors de la mise en contact du gel avec le sérum, la perte de la coloration bleue due au fait que la PFK_M greffée a été obtenue par électro-élution d'un gel coloré au Bleu de Coomassie.

Elle reflète peut-être le décrochage du ligand et expliquerait peut-être le faible rendement.

C'est pour ces diverses raisons que nous avons abandonné cette voie d'approche au profit de l'injection de PFK_M électro-éluée, ce qui constitue à notre avis un autre moyen d'obtention d'un sérum monospécifique.

3.5 Analyse des Ac obtenus par injection de la PFK_M électro-éluée.

3.5.1 Analyse qualitative par la méthode du Dot-blot.

La photographie 14 montre les réactions de dilutions 1/500 des séra du rat injecté à la PFK_M électro-éluée et du rat-contrôle avec 100 ng de l'Ag correspondant.

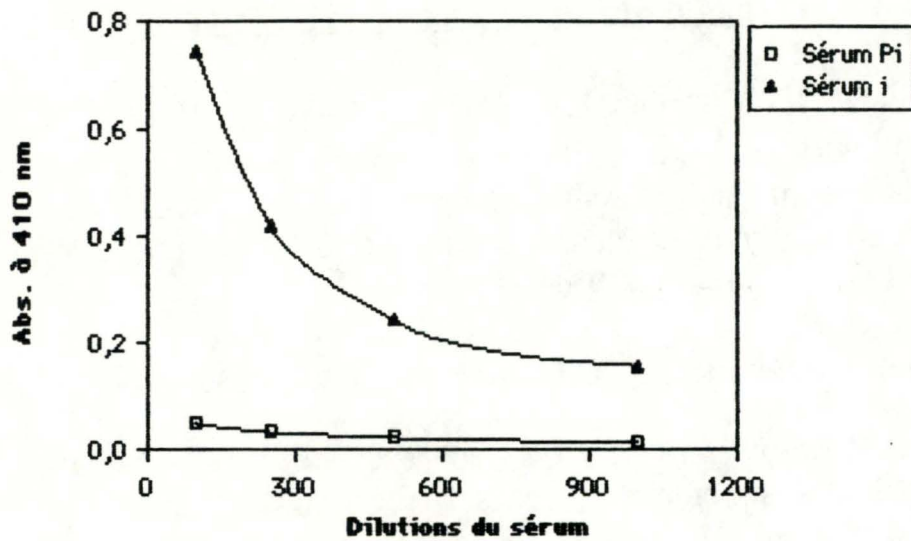
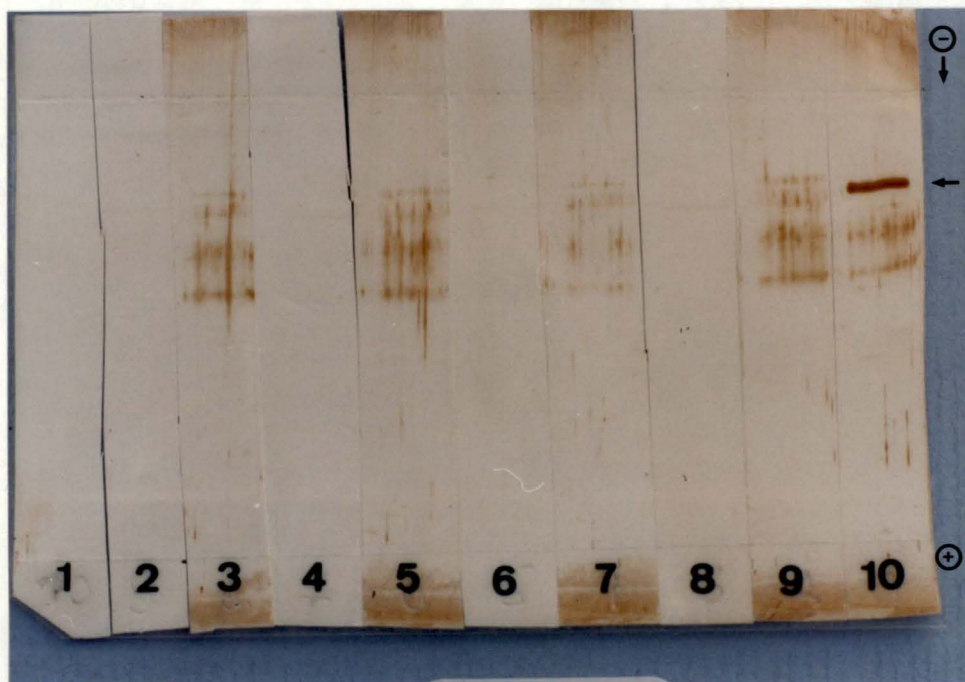


Fig. 20: Spécificité du sérum du rat (X 1 mg) vis-à-vis de la PFK_M



Photographie 15: □

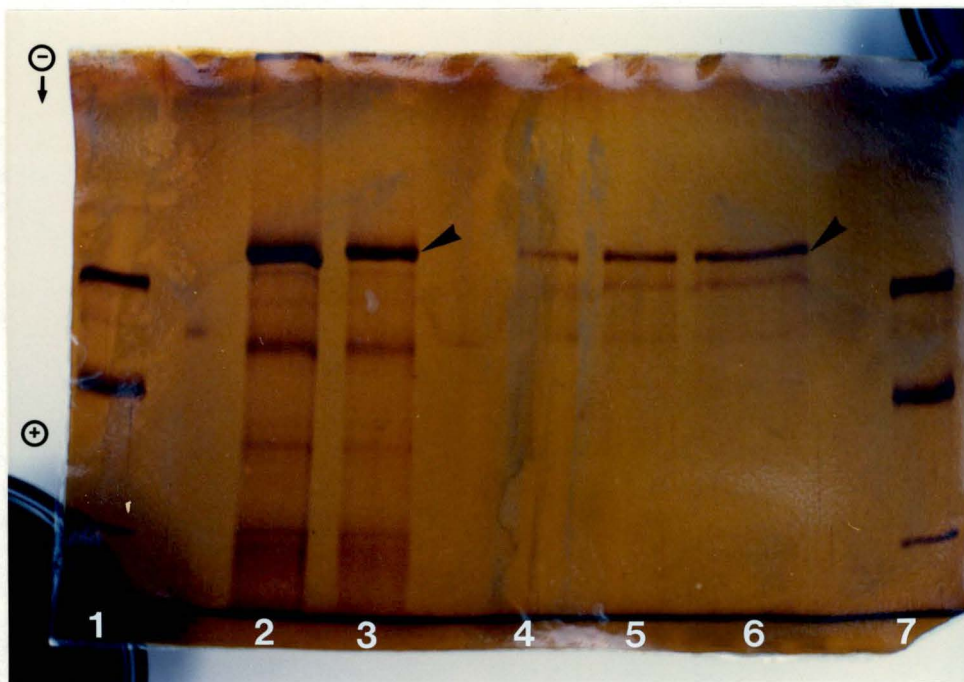
- Piste 1: PFK du muscle 0,2 µg - Dil. 400 X
- Piste 2: BA 0,5 µg - Dil. 400 X
- Piste 3: BA 0,5 µg - Dil. 400 X (rat X 0,5 mg)
- Piste 4: BA 2 µg - Dil. 400 X
- Piste 5: BA 2 µg - Dil. 400 X (rat X 0,5 mg)
- Piste 6: BP 0,5 µg - Dil. 400 X
- Piste 7: BP 0,5 µg - Dil. 400 X (rat X 0,5 mg)
- Piste 8: BP 2 µg - Dil. 400 X
- Piste 9: BP 2 µg - Dil. 400 X (rat X 0,5 mg)
- Piste 10: PFK du muscle 0,2 µg - Dil. 400 X (rat X 0,5 mg)

Sérum Préimmun
Sérum immun

* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot



Photographie 16: *

Piste 1: Etalons Pharmacia: 10 μ l de la fiole "stock" diluée 30 X

Piste 2: PFK du muscle 2 μ g

Piste 3: PFK du muscle 1 μ g

Piste 4: PFK du muscle électro-éluée \pm 0,5 μ g

Piste 5: PFK du muscle électro-éluée \pm 1 μ g

Piste 6: PFK du muscle électro-éluée \pm 2 μ g

Piste 7: Etalons Pharmacia: 10 μ l de la fiole "stock" diluée 30 X

* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot

3.5.2 Analyse quantitative par la méthode ELISA.

Nous effectuons ce test sur le sérum obtenu après la première injection. La figure 20 montre que le rat a fabriqué des Ac anti-PFK_M. Leur titre est situé entre les dilutions 250 et 500 fois.

Par ces deux analyses, nous pouvons dire que nous disposons d'anticorps dans le sérum de rat qui reconnaissent vraisemblablement la PFK_M. Toutefois, pour l'affirmer nous recourons à la technique de l'immunoblot.

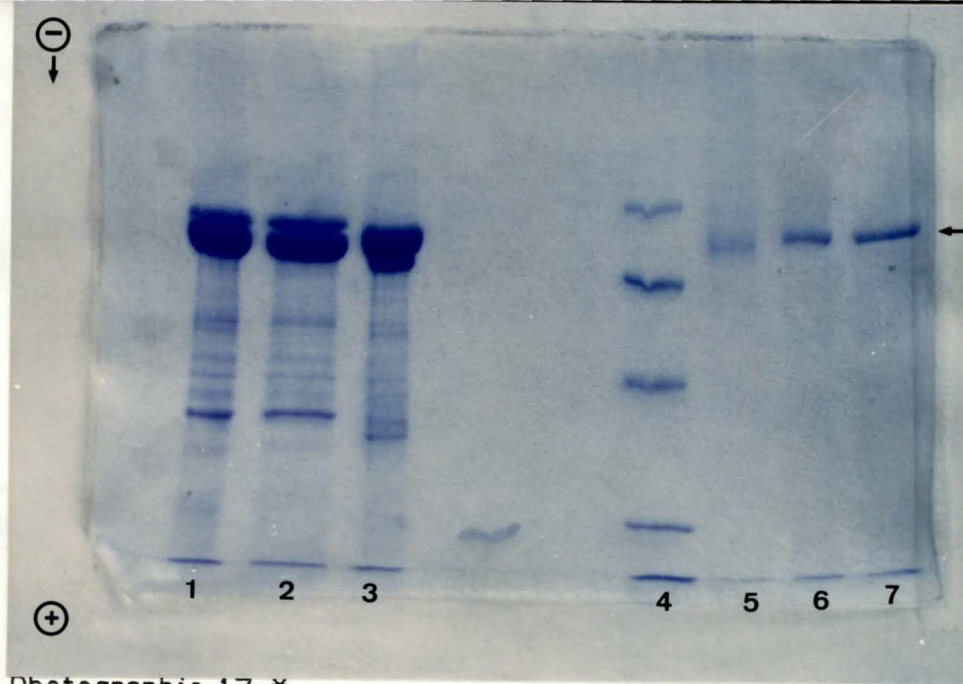
3.5.3 Examen des protéines reconnues par le nouvel Ac au moyen de l'immunoblot.

La photographie 15 présente les résultats obtenus lorsqu'on fait réagir ce sérum dilué 400 fois sur de la PFK_M ou sur des protéines branchiales (branchies antérieures et postérieures).

Si on examine la piste 10, bien qu'il existe une réponse nette de la PFK_M à l'Ac, on distingue aussi deux à trois bandes contaminantes similaires à celles observées précédemment (photographies 8 et 9). Ce phénomène se répète lorsque l'Ag est une mosaïque de protéines branchiales. Comme ces bandes n'apparaissent pas sur les pistes-contrôle et puisque l'antigène a été purifié par électro-élution, la seule hypothèse plausible est que celles-ci, de PM inférieur à 77.000, soient une ou plusieurs PFK₁ partiellement protéolysées.

3.5.4 Visualisation de l'état de purification de la PFK_M électro-éluée par coloration à l'argent d'un gel SDS-PAGE.

En comparant les pistes 2, 3, 4, 5 et 6 de la photographie 16, qui correspondent respectivement à de la PFK_M avant et après électro-élution, il est évident que certains contaminants ont été éliminés. Il s'agit en majorité de protéines dont le PM est inférieur à 43.000. Cependant, aux alentours de 60.000 on détecte encore les mêmes bandes parasites qu'en immunoblot. Deux explications sont possibles. Il pourrait s'agir d'une PFK_M dégradée comme signalé précédemment. Dans ce cas, on devrait observer un ou plusieurs peptides de plus petit PM. Or, ceci n'apparaît ni en immunoblot, ni par coloration à l'argent du pattern électrophorétique. Notons cependant que, si ceux-ci sont très petits, ils se retrouvent dans le front de migration et sont donc invisibles. Comme l'ont décrit certains auteurs [98], les bandes parasites pourraient également correspondre à un artéfact lié à la présence d'un



Photographie 17: *

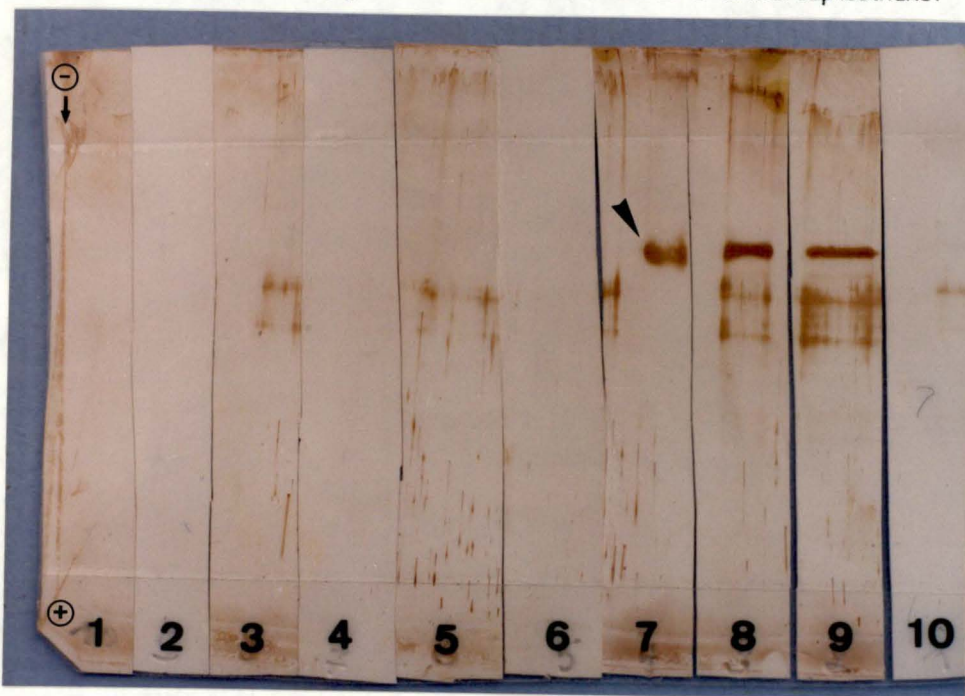
- Piste 1: BP 20 µg - Solubiliseur contenant du DTT
 Piste 2: BP 20 µg - Solubiliseur contenant du 2-β mercaptoéthanol
 Piste 3: BP 20 µg - Solubiliseur sans réducteur
 Piste 4: Etalons Pharmacia
 Piste 5: PFK du muscle 1 µg - solubiliseur sans réducteur
 Piste 6: PFK du muscle 1 µg - solubiliseur contenant du DTT
 Piste 7: PFK du muscle 1 µg - solubiliseur contenant du 2-β mercaptoéthanol

Sérum Préimmun
Sérum immun

* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot



Photographie 18: □

- Piste 1: Solubiliseur sans réducteur 10µl - **Dil. 400 X (rat X 1 mg)**
 Piste 2: Solubiliseur sans réducteur 10µl - Dil. 400 X
 Piste 3: Solubiliseur contenant du DTT 10 µl - **Dil. 400 X (rat X 1 mg)**
 Piste 4: Solubiliseur contenant du DTT 10 µl - Dil. 400 X
 Piste 5: Solubiliseur contenant du 2-β mercaptoéthanol 10 µl - **Dil. 400 X (rat X 1 mg)**
 Piste 6: Solubiliseur contenant du 2-β mercaptoéthanol 10 µl - Dil. 400 X
 Piste 7: PFK du muscle 0,2 µg - solubiliseur sans réducteur - **Dil. 400 X (rat X 1 mg)**
 Piste 8: PFK du muscle 0,2 µg - solubiliseur contenant du DTT - **Dil. 400 X (rat X 1 mg)**
 Piste 9: PFK du muscle 0,2 µg - solubiliseur contenant du 2-β mercaptoéthanol - **Dil. 400 X (rat X 1 mg)**
 Piste 10: PFK du muscle 0,2 µg - solubiliseur contenant du 2-β mercaptoéthanol - Dil. 400 X

réducteur, le 2- β mercaptoéthanol. Toutefois, leur apparition en immunoblot n'a été décrite que récemment [99].

3.6 Origine des bandes artéfactuelles.

3.6.1 Etude du pattern électrophorétique de la PFK_M et des protéines branchiales avec et sans réducteur.

Afin de tester les deux hypothèses émises quant à la nature des bandes parasites "ubiquistes", nous devons d'abord vérifier les patterns électrophorétiques de la PFK_M et des protéines branchiales obtenus avec réducteur (2- β mercaptoéthanol ou dithiothréitol), et sans réducteur.

Comme le montre la photographie 17, mise à part une légère diffusion au niveau de la bande protéique de ± 77.000 , le pattern de la PFK_M est peu affecté lorsqu'on omet le réducteur. Cette diffusion serait peut-être due au fait que la chaleur seule ne parvient pas à rompre toutes les liaisons covalentes, ce qui empêcherait le SDS de dérouler complètement la protéine (voir point 6.3 de "Matériel et méthodes"). Quant au pattern des protéines branchiales, il est modifié en absence de réducteur, notamment aux environs des PM qui nous intéressent.

L'effet des deux réducteurs semble similaire puisqu'on ne distingue pas de différences dans la migration des bandes protéiques.

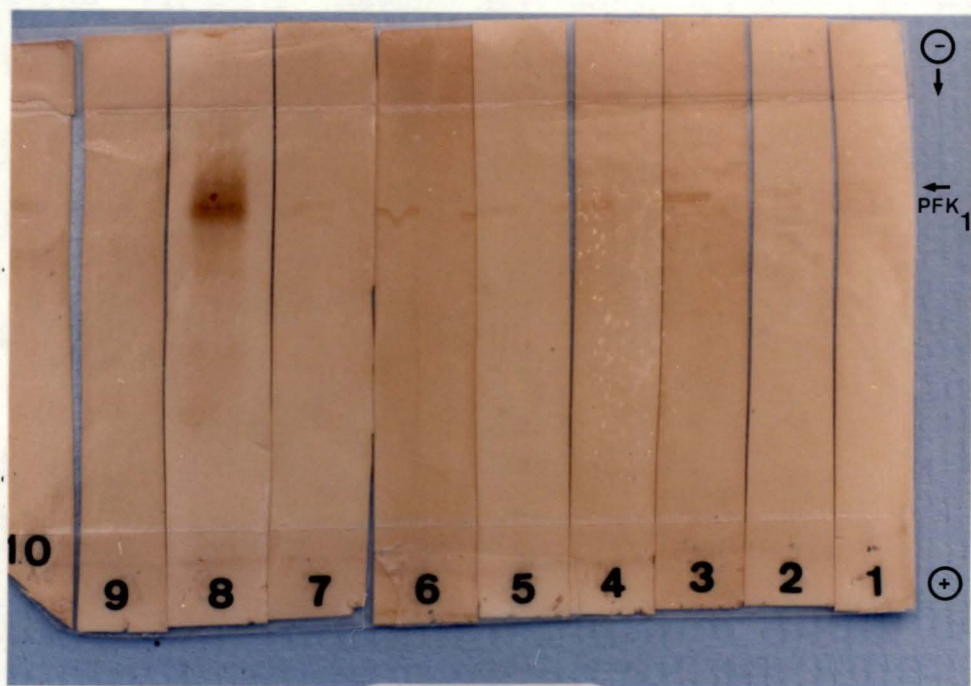
3.6.2 Influence des réducteurs sur l'apparition des bandes parasites en immunoblot.

L'immunoblot présenté à la photographie 18 apporte une réponse au problème posé. C'est en présence de réducteur que des bandes parasites apparaissent. En effet, en l'absence de réducteur (piste 7), on observe une seule bande à ± 77.000 .

De plus, lorsqu'on fait migrer seul du solubilisateur contenant soit du 2- β mercaptoéthanol, soit du dithiothréitol (pistes 3 et 5), les bandes parasites apparaissent à nouveau en présence de sérum immun (i).

3.7 Les Ac anti-PFK_M reconnaissent des protéines branchiales (branchies antérieures et postérieures) de ± 77.000 .

La mise en évidence d'artéfacts de PM compris entre 43.000 et 67.000 nous permet à première vue de rejeter l'hypothèse selon laquelle des Ac ont été



Photographie 19: □

- Piste 1: PFK du muscle 100 ng - Dil. 2000 X
- Piste 2: BP 100 ng - Dil. 2000 X
- Piste 3: BP 100 ng - **Dil. 2000 X (rat PFK 1 mg)**
- Piste 4: BP 100 ng - **Dil. 2000 X (rat PFK 0,5 mg)**
- Piste 5: BP 100 ng - **Dil. 2000 X (rat PFK 0,25 mg)**
- Piste 6: BP 100 ng - **Dil. 500 X (rat X 1 mg)**
- Piste 7: BP 100 ng - Dil. 500 X
- Piste 8: PFK du muscle 100 ng - **Dil. 2000 X (rat PFK 1 mg)**
- Piste 9: PFK du muscle 100 ng - Dil. 500 X
- Piste 10: PFK du muscle 100 ng - **Dil. 500 X (rat X 1 mg)**

Sérum Préimmun
Sérum immun

* gel SDS-PAGE

◇ Dot-blot

□ Immunoblot

produits contre des protéines contaminantes.

Comme cela apparaît sur la photographie 19, quel que soit le sérum utilisé (rat X ou rat PFK_M), et en l'absence de réducteur dans l'échantillon, les Ac reconnaissent trois bandes sur le pattern branchial. Les deux supérieures, qui semblent correspondre à celles visualisées sur le pattern de la PFK_M (piste 8), ont déjà été observées précédemment (photographie 8).

3.8 Conclusions.

Les nombreux détours effectués dans cette recherche immunologique montrent la difficulté de produire un sérum polyclonal monospécifique. Malgré l'ubiquité et la stabilité relative de la PFK₁ dans le règne animal, nous avons obtenu des Ac anti-PFK_M de rat dirigés contre l'enzyme du muscle squelettique de lapin. La technique de chromatographie d'affinité qui nous a permis d'y arriver, s'est montrée malheureusement très peu rentable. L'élimination du réducteur dans le solubilisateur nous a permis d'identifier avec un sérum polyclonal la PFK_M sur un pattern électrophorétique. La présence de bandes non désirées entre 43.000 et 67.000 s'est avérée être un artéfact révélé en présence de 2-β mercaptoéthanol sur électrophorèse SDS-PAGE. Ces bandes seraient dues à des kératines de la peau introduites par inadvertance dans l'échantillon et qui peuvent être détectées par coloration au Bleu de Coomassie ou à l'argent. Elles peuvent également poser problème sur immunoblot. En effet, certains antisera contiendraient des Ac dirigés contre la kératine de la peau humaine. Celle-ci posséderait une protéine prédominante d'environ 180.000 qui serait réduite par le 2-β mercaptoéthanol en deux bandes de PM situé entre 43.000 et 67.000 [99,100].

L'utilisation de la sonde (Ac anti-PFK_M) dans des réactions croisées avec certaines protéines branchiales, ne nous a pas permis d'identifier les bandes immunopositives comme étant formellement la PFK₁. Une inhibition de son activité enzymatique par les anticorps anti-PFK_M le confirmerait.

Si l'hypothèse d'une PFK₁ branchiale reconnue par les Ac anti-PFK_M se vérifie, il semblerait que l'enzyme se trouve sous une forme hétéromérique. Les trois bandes observées en immunoblot en seraient une preuve.

Chapitre 4: Discussion générale et perspectives.

Nous avons montré que la fraction cellulaire soluble dans les branchies antérieures et postérieures du crabe chinois euryhalin, *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, présente une activité phosphofructokinase. L'étude cinétique entamée laisse présager qu'il s'agit d'un enzyme multimodulé, analogue à celui des vertébrés, bien que possédant certaines particularités telle son insensibilité au citrate.

A coté du contrôle exercé par les effecteurs que nous avons étudiés et celui d'autres modulateurs, il est vraisemblable que les modifications covalentes induites par phosphorylations réversibles puissent intervenir dans la régulation. En effet, la branchie est la cible de certains facteurs hormonaux et de bioamines tels le facteur hyperglycémiant (CHH), la sérotonine et la dopamine dont l'action est relayée par un second messenger, l'AMPc. Dans la fonction iono- et osmorégulatrice de la branchie, le signal calcique via la calmoduline et la protéine kinase C pourrait également intervenir dans ces réactions de phosphorylation.

Dans ce contexte de l'activité transportrice et du métabolisme énergétique, nous avons montré par des techniques d'électrophorèse et d'autoradiographie que des protéines branchiales peuvent être phosphorylées et que l'une d'entre elles pourrait correspondre à la PFK₁.

Pour identifier cette protéine, nous avons utilisé l'approche immunologique. Elle nous a permis d'obtenir un sérum polyclonal monospécifique de la PFK_M du lapin. Cette sonde constitue peut-être un outil performant pour la détection de la PFK₁, phosphorylée ou non suivant les conditions physiologiques de l'animal.

Dans cette optique, la méthode de phosphorylation de protéines sur nitrocellulose décrite par Valtorta nous paraît devoir être exploitée.

Nous allions alors les avantages de la sonde immunologique et ceux de la technique d'autoradiographique [101].

D'un point de vue pratique, l'injection de la PFK_M de lapin à d'autres animaux que le rat tel le mouton, nous permettrait d'avoir une plus grande quantité de matériel homogène à notre disposition. Rappelons ici que chaque prélèvement dans le coeur de rat n'excède pas 0,5 ml.

Si le test d'inhibition d'activité de la PFK₁ se révèle inadéquat, il sera nécessaire de purifier l'enzyme branchial. Dans ce cas, notre choix se porterait sur la technique décrite par Sale & Denton, qui utilisent la chromatographie d'affinité sur Cibacron Blue. Celle-ci permet de purifier mille fois l'enzyme en

une seule étape [58].

Finalement, nous proposons d'analyser via les modifications cinétiques que cela entraîne, le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité de l'enzyme branchial et d'aborder le contrôle éventuel de ces modifications covalentes réversibles par diverses sécrétions endocrines. Cette dernière démarche est permise par perfusion de branchies isolées.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Lehninger, A.L.
Chapitre 16. La glycolyse.
Biochimie Flammarion Médecine-Sciences, seconde édition, 413-436. (1975)
- 2 Stryer, L.
Biochemistry. Chapitre 12. Glycolysis.
W.H. Freeman and company. San Fransisco, seconde édition, 255-282. (1981)
- 3 Storey, K.B.
A Re-evaluation of the Pasteur effect : New mechanisms in anaerobic metabolism.
Mol. Physiol., 8, 439-461. (1985)
- 4 Caussin, A.
Effet de la température sur le métabolisme des hydrates de carbone chez le homard (*Homarus americanus* H. Milne Edwards) : rôle de la kinase du pyruvate dans la régulation de ce métabolisme.
Mémoire de licence en Sc. Zool. FNDP. (1981)
- 5 Cortesi, P. & Carpena, E.
Anaerobic metabolism on *Venus gallina* and *Scapharca inequivalvis* (Bruguère).
Effects of modulations on pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase.
Oceanis, 7, 599-612. (1981)
- 6 Kreutzer, U., Siegmund, B. & Grieshaber, K.
Role of coupled substrates and alternative end products during hypoxia tolerance in marine invertebrates.
Mol. Physiol., 8, 371-392. (1985)
- 7 Meinardus-Hager, G. & Gäde, G.
The pyruvate branchpoint in the anaerobic energy metabolism of the jumping cockle *Cardium tuberculatum* L. : D-lactate formation during environmental anaerobiosis versus octopine formation during exercise.
Exp. Biol., 45, 91-110. (1986)
- 8 Pörtner, H.O., Kreutzer, U., Siegmund, B., Heisler, N. & Grieshaber, M.K.
Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia.
Mar. Biol., 79, 237-247. (1984)
- 9 Boulton, A.P. & Huggins, A.K.
Glycolytic activity in crustaceans.
Comp. Biochem. Physiol., 33, 491-498. (1970)

- 10 Puyear, R.L., Wang, C.H. & Pritchard, A.W.
Pathways of carbohydrate in the intermoult crayfish *Pacifascatus leniusculus*
Comp. Biochem. Physiol., 14, 115-143. (1965)
- 11 Mc Whinnie, M.A. & Kirchenberg, R.J.
Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermoult cycle.
Comp. Biochem. Physiol., 6, 159-170. (1962)
- 12 Mc Whinnie, M.A. & Corkill, A.J.
The hexosemonophosphate pathway and its variation in the intermoult cycle in
crayfish.
Comp. Biochem. Physiol., 12, 81-93. (1964)
- 13 Kallapur, V.L., Ramamohanrao, Y. & Narasubhai, A.V.
Glycolytic enzymes in the premolt field crab *Paratelphusa hydrodromus*
(Milne-Edwards) (Crustacea).
Arch. Int. Physiol. Biochim., 91, 127-132. (1983)
- 14 Carlsson, K.H. & Gäde G.
Metabolic adaptation of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, during exercise
and environmental hypoxia and subsequent recovery.
Biol. Bull., 171, 217-235. (1986)
- 15 Trausch, G.
Etude de l'activité glycolytique chez un crustacé, *Homarus vulgaris* M. Edw.
Thèse de doctorat en Sc. Chimiques. (1975)
- 16 Mantel, L.H. & Farmer, L.L.
Osmotic and ionic regulation.
In: The Biology of Crustacea, 5, Ed. by Mantel, L.H. Academic Press
Ch. 2, 54-143. (1983)
- 17 Thabrew, M.I., Poat, P.C. & Munday, K.A.
Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue.
Comp. Biochem. Physiol., 40B, 531-541. (1971)
- 18 Masters, C.
Interactions between glycolytic enzymes and components of the cytomatrix.
J. Cell Biol., 99, 222s-225s. (1984)
- 19 Masters, C.J., Reid, S. & Don, M.
Glycolysis-New concepts in an old pathway.
Mol. Cell. Biochem., 76, 3-14. (1987)

- 20 Uyeda, K.
Phosphofructokinase.
Adv. Enz., 48, 193-244. (1979)
- 21 Ramaiah, A.
Pasteur effect and phosphofructokinase.
Curr. Top. Cell. Regul., 8, 297-345. (1974)
- 22 Sols, A., Castaño, J.G., Aragón, J.J., Domenech, C., Lazo, P.A. & Nieto, A.
Multimodulation of phosphofructokinases in metabolic regulation.
In: Metabolic interconversion of Enzymes. Ed. By Holzer, pp 111-123. Springer
Verlag, Berlin, New-York, Sheidelberg. (1981)
- 23 Hofer, H.W.
Phosphorylation of phosphofructokinase - The possible role of covalent
modification in the regulation of glycolysis.
In: Regulation of Carbohydrate metabolism., 1, ch. 5, Ed. by Beitner, R. CRC Press
Florida. (1985)
- 24 Van Schaftingen, E.
Fructose 2,6- biphosphate.
Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur - UCL. (1985)
- 25 Kamemoto, E.S., Iltch, M.H., Lan, L. & Mansour, T.E.
Phosphofructokinase from *Fasciola hepatica*: Activation by phosphorylation and
other regulatory properties distinct from the mammalian enzyme.
Arch. Biochem. Biophys., 258, 101-111. (1987)
- 26 Ebberink, R.H.M.
Control of adductor muscle phosphofructokinase activity in the sea mussel *Mytilus
edulis* during anaerobiosis.
Mol. Physiol., 2, 345-355. (1982)
- 27 Poorman, R.A., Randolph, A., Kemp, R.G. & Heinrikson, R.L.
Evolution of phosphofructokinase-gene duplication of new effector sites.
Nature, 309, 467-468. (1984)
- 28 Aguilar, Z. & Urbina, J.A.
The phosphofructokinase of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi*: purification and
kinetic mechanism.
Mol. Biochem. Parasitology, 21, 103-111. (1986)

- 29 Storey, K.B.
Regulation of cockroach flight muscle phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate. Role in the activation of muscle metabolism during flight.
FEBS Lett., 161, 265-268. (1983)
- 30 Storey, K.B.
Phosphofructokinase from flight muscle of the cockroach, *Periplaneta americana*. Control of enzyme activation during flight.
Insect Biochem., 15, 663-666. (1985)
- 31 Wegener, G., Beinhauer, I., Klee, A. & Newsholme, E.A.
Properties of locust muscle 6-phosphofructokinase and their importance in the regulation of glycolytic flux during prolonged flight.
J. Comp. Physiol. B, 157, 315-326. (1987)
- 32 Wegener, G., Schmidt, H., Leech, A.R. & Newsholme, E.A.
Antagonist effects of hexose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate on the activity of 6-phosphofructokinase from honey-bee flight muscle.
Biochem. J., 236, 925-928. (1986)
- 33 Lesicki, A.
The regulation of phosphofructokinase activity in hepatopancreas and abdominal muscle of crayfish *Orconectes limosus* raf. (Crustacea : decapoda).
Comp. Biochem. Physiol., 66B, 291-296. (1980)
- 34 Little, D.I., Giles, I.G. & Poat, P.C.
A kinetic study on phosphofructokinase isolated from the muscle of *Carcinus maenas* (the common shore crab). Biochem.
Soc. Trans., 8, 142-143. (1980)
- 35 Storey, K.B.
Fructose 2,6-bisphosphate and anaerobic metabolism in marine molluscs.
FEBS Lett., 181, 245-248. (1985)
- 36 Vora, S., Wims, L.A., Durham, S. & Morrison, S.L.
Production and characterization of monoclonal antibodies to the subunits of human phosphofructokinase : New tools for the immunochemical and genetic analyses of isozymes.
Blood, 58(4), 823-829. (1981)
- 37 Kahn, A., Meienhofer, M.C., Cottreau, D., Lagrange, J.L., & Dreyfus, J.C.
Phosphofructokinase (PFK) isoenzymes in man. Studies of adult human tissues.
Hum. Genet., 48, 93-108. (1979)

- 38 Tsai, M.Y.
Isozymes of rabbit phosphofructokinase. Electrophoretic and immunochemical studies.
J. Biol. Chem., 248, 785-792. (1972)
- 39 Khoja, S.M.
Phosphofructokinase from the epithelial cells of rat small intestine. Comparison of regulatory properties with those of skeletal muscle, liver and brain phosphofructokinase.
Comp. Biochem. Physiol., 85B, 337-341. (1986)
- 40 Khoja, S.M. & Kellett, G.L.
Phosphofructokinase D from the epithelial cells of rat small intestine.
Biochem. J., 215, 335-341. (1983)
- 41 Khoja, S.M., Beach, N.L. & Kellett, G.L.
The isolation and characterization of phosphofructokinase from the epithelial cells of rat small intestine.
Biochem. J., 211, 373-379. (1983)
- 42 Vora, S.
Isozyme of human phosphofructokinase in blood cells and cultured cell lines : Molecular and genetic evidence for a trigenic system.
Blood, 57(4), 724-732. (1981)
- 43 Dunaway, G.A., Kasten, T.P., Sebo, T. & Trapp, R.
Analysis of the phosphofructokinase subunits and isozymes in human tissues.
Biochem. J., 251, 677-683. (1988)
- 44 Trigun, S.K. & Singh, S.N.
Differential expressions of phosphofructokinase isozymes in different tissues of young and old rats.
Cell. Mol. Biol., 33, 767-774. (1987)
- 45 Thrasher, J.R., Cooper, M.D. & Dunaway, G.A.
Developmental changes in heart and muscle phosphofructokinase isozymes.
J. Biol. Chem., 256, 7844-7848. (1981)
- 46 Gilles, R. & Pequeux, A.
Interactions of chemical and osmotic regulation with the environment.
In : The Biology of Crustacea, 8, Ed. by Vernberg, F.J. and Vernberg, W.B. Academic Press ch. 4, 109-177. (1983)

- 47 Sols, A.
Multimodulation of enzyme activity.
Curr. Top. Cell. regul., 19, 77-101. (1981)
- 48 Orosz, F., Christova, T.Y. & Ovadi, J.
Functional *in vitro* test of calmodulin antagonist : effect of drugs on interactions between calmodulin and glycolytic enzymes.
Mol. Pharmacol., 33, 678-682. (1988)
- 49 Kamemoto, E.S. & Mansour, T.E.
Phosphofructokinase in the fluke *Fasciola hepatica*. Purification and kinetic changes by phosphorylation.
J. Biol. Chem., 261, 4346-4351. (1986)
- 50 Krebs, E.G.
The phosphorylation of proteins : a major mechanism for biological regulation.
Bioch. Soc. T., 13 (5), 813-820. (1985)
- 51 Cohen, P.
The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity.
Eur. J. Biochem., 151, 439-448. (1985)
- 52 Sparks, J.N. & Brautigan, D.L.
Molecular basis for substrate specificity of protein kinases and phosphatases.
Int. J. Biochem., 18, 497-504. (1986)
- 53 Sale, E.M., White, M.F. & Kahn, R.
Phosphorylation of glycolytic and glucogenesis enzymes by insulin receptor kinase.
J. Cell. Biochem., 33, 15-26. (1987)
- 54 Domenech, C.E., Mieskes, G. & Söling, H.D.
Does rat liver 6-phospho-1-fructokinase exhibit "Half-of-the-sites-phosphorylation"?
Eur. J. Biochem., 173, 79-84. (1988)
- 55 Hofer, H.W., Schlatter, S. & Graefe, M.
Phosphorylation of phosphofructokinase by protein kinase C changes the allosteric properties of the enzymes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 129, 892-897. (1985)
- 56 Mieskes, G., Kuduz, J. & Söling, H.D.
Are calcium-dependent protein kinases involved in the regulation of

glycolytic/gluconeogenic enzymes ?

Studies with Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C.
Eur. J. Biochem., 167, 383-389. (1987)

57 Kitajima, S., Sakakibara, R. & Uyeda, K.

Significance of phosphorylation of phosphofructokinase.
J. Biol. Chem., 258, 13292-13298. (1983)

58 Sale, E.M. & Denton, R.M.

Adipose - tissue phosphofructokinase.
Rapid purification and regulation by phosphorylation *in vitro*
Biochem. J., 232, 897-904. (1985)

59 Lagrange, J.L., Marie, J., Cottreau, D., Fischer, S. & Kahn, A.

Endogenous phosphorylation of soluble enzymes in human red cells. Cyclic
3',5'-AMP-dependent phosphorylation of phosphofructokinase without detectable
regulatory effect.
Biochim. Biophys. A., 612, 213-225. (1980)

60 Kulkarni, G., Rao, G.S.J., Srinivasan, N.G.S., Hofer, H.W., Yuan, P.M. & Harris, B.G.

Ascaris suum phosphofructokinase.
Phosphorylation by protein kinase and sequence of the phosphopeptide.
J. Biol. Chem., 262, 32-34. (1987)

61 Srinivasan, N.G., Wariso, B.A., Kulkarni, G., Rao, G.J. & Harris, B.G.

Phosphofructokinase from *Dirofilaria immitis*
Stimulation of activity by phosphorylation with cyclic AMP-dependent protein
kinase.
J. Biol. Chem., 263 (7), 3482-3485. (1988)

62 Storey, K.B.

Phosphofructokinase from foot muscle of whelk, *Busycotypus canaliculatum*:
Evidence for covalent modification of the enzyme during anaerobiosis.
Arch. Biochem. Biophys., 235, 665-672. (1984)

63 Lawson, J.R.W. & Uyeda, K.

Effects of insulin and work on fructose 2,6-bisphosphate content and
phosphofructokinase activity in perfused rat hearts.
J. Biol. Chem., 262, 3165-3173. (1987)

- 64 Sale, E.M. & Denton, R.M.
β-adrenergic agents increase the phosphorylation of phosphofructokinase in isolated rat epididymal white adipose tissue.
Biochem. J., 232, 905-910. (1985)
- 65 Dunaway, G.A., Leung, G.L.Y., Thrasher, J.R. & Cooper, M.D.
Turn over of hepatic phosphofructokinase in normal and diabetic rats. Role of insulin and peptide stabilizing factor.
J. Biol. Chem., 253, 7460-7463. (1978)
- 66 Dunaway, G.A. & Weber, G.
Effects of hormonal and nutritional changes on rates of synthesis and degradation of hepatic phosphofructokinase isozymes.
Arch. Biochem. Biophys., 162, 629-637. (1974)
- 67 Castaño, J.G., Nieto, A. & Feliu, J.E.
Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes.
J. Biol. Chem., 254, 5576-5579. (1979)
- 68 Sangster, N.C. & Mettrick, D.F.
Effects of 5-hydroxytryptamine, cyclic AMP, AMP and fructose-2,6-bisphosphate on phosphofructokinase activity in *Hymenolepsis diminuta*.
Comp. Biochem. Physiol., 88B, 317-321. (1987)
- 69 Kwiatkowska, D. & Szechinski, J.
The effect of adrenal steroids on human erythrocyte phosphofructokinase.
Arch. Immunol. Ther. Exp., 34, 445-450. (1986)
- 70 Pequeux, A.J.R., & Gilles, R.
Control of extracellular fluid - Osmolality in crustaceans.
In: Lecture notes on coastal and estuaire studies.
9, osmoregulation in estuaire and marine animals
Ed. by A. Pequeux, R. Gilles, & L. Bolis, Springer-Verlag
Berlin, Heildeberg, New-York, Tokyo. (1984)
- 71 Wheatly, M.J.
The role of the antennal gland in ion and acid-base regulation during hyposaline exposure of the Dungeness crab *Cancer magister* (Dana).
J. Comp. Physiol., 155B, 445-454. (1985)

- 72 Wanson, S., Pequeux, A. & Leray, C.
Effect of salinity changes on adenylate energy charge in gills of two euryhaline crabs.
Arch. Int. Physiol. Bioch., 91 (2), B81-B82. (1983)
- 73 Keller, R. & Andrew, E.M.
The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone.
Gen. Comp. Endoc., 20, 572-578. (1973)
- 74 Spindler, K., Willig, A. & Keller, R.
Cyclic nucleotides and crustacean blood glucose levels.
Comp. Biochem. Physiol., 54, 301-304. (1975)
- 75 Keller, R. & Seldmeier, D.
Hyperglycemic hormones in crustaceans.
In: Comparative Endocrinology (P.J. Gaillard, & H.H. Boers, Eds.), 437-440.
Elsevier/ North Holland, Amsterdam. (1978)
- 76 Herault, J.P.E. & Proux, J.P.
Cyclic AMP: the second messenger of an antidiuretic hormone from the glandular lobes of the migratory locust corpora cardiaca.
J. Insect Physiol., 33, 487-491. (1987)
- 77 Renard, C.
Influence de l'injection de bioamines sur la glycémie d'un crustacé décapode macroure, *Homarus americanus* (H. Milne Edwards).
Mémoire de licence en Sc. Zool. FNDP. (1980)
- 78 Scheide, J.I. & Dietz, T.H.
Serotonin regulation of gill cAMP production, Na⁺ and water uptake in freshwater mussels.
J. Exp. Zool., 240, 309-314. (1986)
- 79 Scheide, J.I. & Dietz, T.H.
Serotonin-stimulated adenylate cyclase in the gill of freshwater mussel and its relationship to sodium transport.
Physiol. Zool., 56(4), 585-596. (1983)
- 80 Scheide, J.I. & Dietz, T.H.
The effects of calcium on serotonin-stimulated adenylate cyclase in freshwater mussels.
Biol. Bull., 166, 594-607. (1984)

- 81 Stommel, E.W. & Stephens, R.E.
Cyclic AMP and calcium in the differential control of *Mytilus* gill cilia.
J. Comp. Physiol. A., 157, 451-459. (1985)
- 82 Lohrmann, D.M. & Kamemoto, F.I.
The effect of dibutyryl cAMP on sodium uptake by isolated perfused gills of
Callinectes sapidus
Gen. Comp. Endocrinol., 65, 300-305. (1987)
- 83 Kuo, J.F., Wyatt, G.R. & Greengard, P.
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
IX. Partial purification and some properties of guanosine
3',5'-monophosphate-dependent and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent
protein kinases from various tissues and species of Arthropoda.
J. Biol. Chem., 246, 7159-7167. (1971)
- 84 Kuo, J.F. & Greengard, P.
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein
kinase in various tissues and phyla of animal kingdom.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 64, 1349-1355. (1969-b)
- 85 Goy, M.F., Schwarz, T.L. & Kravitz, E.A.
Serotonin-induced protein phosphorylation in a lobster neuromuscular preparation.
J. Neurosci., 4, 611-626. (1984)
- 86 Bauchau, A.
La vie des crabes.
Ed. Lechevalier P. - Paris. (1966)
- 87 Köhler, G. & Milstein, C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature, 256, 495. (1975)
- 88 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.
Protein measurement with Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275. (1951)
- 89 Bradford, M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem., 72, 248-254. (1976)

- 90 Rudolph, S.A. & Krueger, B.K.
Endogenous protein phosphorylation and dephosphorylation.
Adv. Cyclic Nucl. Res., 10, 107-133. (1979)
- 91 Laemmli, U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685. (1970)
- 92 Towbin, H. & Gordon, J.
Immunoblotting and dot-immuno Binding current status N-outlook.
J. Immunol. Methods, 72, 313-340. (1984)
- 93 Merril, R.C., Switzer, R.C. & Van Keuren, M.L.
Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by
two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4335-4339. (1979)
- 94 Engvall, E.
Enzyme immunoassay ELISA and EMIT.
In: Methods in enzymology
Immunochemical techniques- Part A.
Ed. Van Vunakis, H. & Langone, J.J., 70, 419-439. (1980)
- 95 Affinity chromatography. Principles and methods.
Pharmacia Fine Chemicals. (1979)
- 96 Bergmeyer, H.U.
Methods of enzymatic analysis.
Ed. H.U. Bergmeyer, 4, Academic Press - Verlag Chemie, Weinheim - Germany.
(1974)
- 97 Storey, K.B.
Purification and properties of adductor muscle phosphofructokinase from the
Oyster, *Crassostrea virginica*.
Eur. J. Biochem., 70, 331-337. (1976)
- 98 Tasheva, B. & Dessev, G.
Artifacts in sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis due to
2-mercaptoethanol.
Anal. Biochem., 129, 98-102. (1983)

- 99 Riches, P.G., Polce, B. & Hong, R.
Contaminant bands on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis are recognised by antibodies in normal human serum and saliva.
J. Immunol. Methods, 110, 117-121. (1988)
- 100 Shapiro, S.Z.
Elimination of the detection of an artefactual 65 kDa keratin band from immunoblots.
J. Immun. Methods, 102, 143-146. (1987)
- 101 Valtorta, F.D., Schiebler, W., Jahn, R., Ceccarelli, B. & Greengard, P.
A solid-phase assay for the phosphorylation of proteins blotted on nitrocellulose membrane filters.
Anal. Biochem., 158, 130-137. (1986)