



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

La protéine kinase C et le transport ionique chez le crabe *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards

Asselbourg, Vincent

Award date:
1989

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.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

La " protéine kinase C "
et le transport ionique
chez le crabe *Eriocheir sinensis*
H. Milne-Edwards

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Vincent Asselbourg

Juin 1989

LISTE DES ABREVIATIONS EMPLOYEES

1.	ADP	:	adénosine 5' - diphosphate
2.	AMP	:	adénosine 5' - monophosphate
3.	AMP _c	:	AMP cyclique
4.	ATP	:	adénosine 5' - triphosphate
5.	B.A.	:	branchie antérieure
6.	B.P.	:	branchie postérieure
7.	CPM	:	coups par minute
8.	D	:	dioléine
9.	DG	:	diacylglycérol
10.	DDP	:	différence de potentiel électrique
11.	EDTA	:	Ethylène diamine - acide tétraacétique
12.	EGTA	:	Ethylène glycole - bis - (β - aminoéthyl éther) - N - N, N', N' acide tétraacétique
13.	Fru-6-P	:	fructose 6 - phosphate
14.	Fru-1,6-P ₂	:	fructose 1,6 - biphosphate
15.	GDP	:	guanosine 5' - diphosphate
16.	GMP	:	guanosine 5' - monophosphate
17.	GMP _c	:	GMP cyclique
18.	GTP	:	guanosine 5' - triphosphate
19.	Hepes	:	N - 2 - hydroxyéthylpipérazine - N' - 2 - acide éthanesulfonique
20.	IP ₃	:	inositol triphosphate
21.	K Da	:	Kilodalton
22.	K _m	:	constante de Michaelis-Menten
23.	ml	:	millilitre
24.	mM	:	millimolaire
25.	μM	:	micromolaire
26.	μCi	:	microcurie
27.	μEq.	:	microéquivalent
27.	mV	:	millivolt
28.	nM	:	nanomolaire
29.	nm	:	nanomètre
30.	NAD ⁺	:	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
31.	NADH	:	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
32.	OAG	:	1 - oléyl - 2 - acétyl - Sn- glycérol
33.	P moles	:	pico moles
34.	P _i	:	phosphate inorganique
35.	PFK	:	phosphofructokinase
36.	PIP ₂	:	phosphoinositol diphosphatase
37.	PK _a	:	protéine kinase A
38.	PK _c	:	protéine kinase C
39.	PMA	:	phorbol - 12 - myristate - 13 - acétate
40.	PMSF	:	phenylméthylsulfonyl fluorure
41.	P S	:	phosphatidyl sérine
42.	RPM	:	rotation par minute
43.	Ringer F.W.	:	Ringer "eau douce"
44.	SDS	:	dodécyl sulfate de sodium
45.	TCA	:	acide trichloracétique
46.	TEMED	:	N-N-N'-N'-tétraméthyléthylène diamine
47.	TPA	:	12 - 0 - tétradécanoylphorbol 13 - acétate
48.	Tris	:	Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Télex 59222 facnam-b - Téléfax 081/23.03.91

**La "protéine kinase C" et le transport ionique
chez le crabe *Eriocheir sinensis*
H. Milne-Edwards**

Asselbourg Vincent

Résumé

Une activité protéine kinase C (PKc) est mise en évidence dans la fraction cellulaire soluble des branchies postérieures (B.P.) et antérieures (B.A.) du crabe euryhalin *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

Sur un système de branchies postérieures perfusées, l'addition de deux activateurs de la PKc, le PMA et l'OAG au milieu baignant la face sérosale ("in") provoque une diminution de la DDP transépithéliale, suite à l'activation du transport des cations.

Ce résultat est confirmé par une étude de flux avec du $^{22}\text{Na}^+$ et du $^{36}\text{Cl}^-$ au cours de laquelle les mêmes activateurs de la PKc, ajoutés au milieu "in", entraînent une augmentation du flux de Na^+ . Le flux de Cl^- n'est par contre, pas modifié.

Dans certaines conditions expérimentales, la phosphofructokinase, enzyme clé de la glycolyse, peut être phosphorylée par la PKc, ce qui entraîne une augmentation de l'affinité pour son substrat.

L'incubation d'une fraction subcellulaire de B.P. et B.A. avec du $[\gamma - ^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, en présence de Ca^{++} , de dioléine et de phosphatidyl sérine provoque et ce uniquement, dans les B.P., une phosphorylation de protéines membranaires qui peut être visualisée par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1989

Promoteur : Révérend Père P. DEVOS

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/22.90.61 - Télex 59222 facnam-b - Téléfax 081/23.03.91

**La "protéine kinase C" et le transport ionique
chez le crabe *Eriocheir sinensis*
H. Milne-Edwards**

Asselbourg Vincent

Abstract

A protein kinase C (PKc) activity has been measured in the soluble cellular fraction of the posterior and anterior gills of the euryhalin crab *Eriocheir sinensis* adapted to fresh water.

The addition of two activators (PMA and OAG) of the PKc to the medium bathing the serosal side of perfused posterior gills induces a reduction of the transepithelial potential which is the result of a increased transport of cations.

This observation is confirmed via a study of ions flow using $^{22}\text{Na}^+$ and $^{36}\text{Cl}^-$ in the presence of both activators in the medium "in" ; the result is a enhanced flow of Na^+ ; the flow of Cl^- being unmodified.

In defined experimental conditions, the phosphofructokinase (PFK), a key enzyme for the glycolysis, can be phosphorylated via the PKc and shows in this condition a higher affinity for its substrate.

The incubation of a subcellular fraction of posterior and anterior gills with [γ - ^{32}P] ATP with in the presence of Ca^+ , diolein and phosphatidyl serine produces, only exclusively, in the posterior gills a phosphorylation of membranous proteins. This can be visualized on a autoradiography of a polyacrylamide gel.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Juin 1989

Promoteur : Révérend Père P. DEVOS

Au terme de cette année, je remercie, pour ses encouragements, le Révérend Père P. Devos, promoteur de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur G. Trausch qui m'a suivi et conseillé tout au long de ce travail.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à Monsieur R. Gilles, Professeur à l'Université de Liège ainsi qu'aux personnes du laboratoire de physiologie et tout particulièrement à Monsieur A. Bianchini, pour leur aide et leurs précieux conseils.

Ma gratitude s'adresse également à Madame M.C. Annet-Forget et à Mademoiselle M.-A. Benoit ainsi qu'à tous les membres de l'Unité d'Hématologie et d'Endocrinologie Comparée pour leur continuel dévouement et leur disponibilité.

Un tout grand merci à Madame E. Bastaits-Boca pour la dactylographie du mémoire.

Enfin, je remercie mes parents qui m'ont apporté leur aide morale et leur soutien.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION

P. 1

1.1. - Osmorégulation chez les crustacés	P.1
1.1.1. - Introduction	P.1
1.1.2. - Morphologie de la branchie	P.3
1.1.3. - Physiologie de la branchie	P.4
a. - Branchies antérieures	
b. - Branchies postérieures	
1.1.4. - Biochimie de la branchie	P.8
1.1.5. - Conclusion	P.12
1.2. - Importance de l'ion Ca ⁺⁺ dans la communication cellulaire	P.13
1.2.1. - Introduction	P.13
1.2.2. - Voie de l'AMP cyclique	P.14
1.2.3. - Le système du GMP cyclique	P.15
1.2.4. - Voie d'activation par le Ca ⁺⁺ (messenger secondaire)	P.15
1.3. - La protéine kinase C (PKc)	P.18
1.3.1. - Introduction	P.18
1.3.2. - Propriétés physico-chimiques	P.18
1.3.3. - Interaction des phospholipides avec la PKc	P.20
1.3.4. - Interaction PK _c - diglycéride	P.21
1.3.5. - Structure de la PKc	P.22
1.4. - Phosphorylation et rôle de la PKc	P.24
1.4.1. - La phosphorylation	P.24
1.4.2. - Phosphorylation de la PKc	P.25
1.4.3. - Les rôles physiologiques de la PKc	P.26
dans la réponse cellulaire	
a. - Action de la PKc chez les vertébrés	
b. - Action de la PKc chez les invertébrés	

II. ORIENTATION DU MEMOIRE

P. 32

III - MATERIEL ET METHODES

P.34

3.1. - Matériel biologique	P.34
3.1.1. - Position systématique et conditions d'élevage	P.34
3.1.2. - Prélèvement des organes	P.34
3.1.3. - Préparation des tissus	P.35
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
- Cerveau de souris	
- Branchies de crabe	
3.2. - Dosages	P.36
3.2.1. - Dosage des protéines	P.36
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
3.2.2. - Dosage de la protéine kinase C	P.37
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
3.2.3. - Dosage de la phosphofructokinase	P.39
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
3.3. - Etude des mouvements ioniques	P.41
3.3.1. - Perfusion des branchies	P.41
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
3.3.2. - Mesure de la différence du potentiel	P.42

3.3.3. - Mesure des flux d'ions	P.43
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
Note	
3.4. - Phosphorylation des protéines endogènes	P.44
3.4.1. - Incubation en présence de [γ - ^{32}P] - ATP	P.44
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
3.4.2. - Préparation des échantillons pour l'électrophorèse	P.45
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	
3.4.3. - Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS)	P.46
a. - Principe	
b. - Solution	
- Running gel	
- Stacking gel	
c. - Mode opératoire	
Remarques	
3.4.4. - Autoradiographie	P.49
a. - Principe	
b. - Solution	
c. - Mode opératoire	

IV - RESULTATS

P.50

4.1. - Dosage de la protéine kinase C	P.50
4.1.1. - Mise en évidence de la protéine kinase C dans le cerveau de souris	P.50
a. - Matériel biologique	
b. - Résultats	
c. - Conclusion	

4.1.2. - Mise en évidence de la PKc dans les branchies du crabe	P. 51
<i>Eriocheir sinensis</i>	
a. - Matériel biologique	
b. - Résultats	
c. - Conclusion	
4.2. - Rôle de la PKc dans l'osmorégulation	P.53
4.2.1. - Introduction	P.53
4.2.2. - Action de diverses substances sur la différence	P. 54
de potentiel (DDP) au niveau des branchies postérieures	
4.2.2.1. - Effets d'activateurs de la PKc	P.54
a. - Matériel biologique	
b. - Résultats	
4.2.2.2. - Effets d'inhibiteurs de la PKc	P.55
c. - Conclusion	
4.2.3. - Action de la PKc sur les flux de Na ⁺ et Cl ⁻	P. 56
a. - Action des activateurs de la PKc sur le flux entrant de	
²² Na ⁺	
b. - Action des esters de phorbol sur le flux entrant et	
sortant de ³⁶ Cl ⁻	
c. - Conclusion	
4.3. - Action de la protéine kinase C sur la phosphofructokinase	P.59
a. - Matériel biologique	
b. - Résultats	
c. - Conclusion	
4.4. - Phosphorylation des protéines membranaires	P.61
a. - Matériel biologique	
b. - Résultats	
c. - Conclusion	

V. DISCUSSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

P.64

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. Osmorégulation chez les crustacés.

1.1.1. Introduction

Les crabes sont des crustacés qui ont la particularité de posséder un ensemble de mécanismes d'osmorégulation très varié :

- certains sont sténohalins, c'est-à-dire qu'ils ne supportent que de faibles variations de la salinité de l'environnement extérieur.
- d'autres sont euryhalins : ils sont capables de vivre dans des environnements à salinité très variable.

Le contrôle de l'osmolalité de l'hémolymphe des crustacés est essentiellement lié à celui des mouvements ioniques.

Cette régulation implique notamment des transports actifs et passifs du Na^+ et du Cl^- entre le milieu extérieur, le milieu intracellulaire et l'hémolymphe.

Le maintien d'un état d'équilibre stable de la composition des fluides internes en fonction de la salinité extérieure tient compte de deux mécanismes importants :

1. des mécanismes limitants dont le but est de minimiser les pertes dues à la diffusion, soit en réduisant les gradients qui engendrent les flux de diffusion, soit en agissant sur les propriétés de perméabilité des structures épithéliales ou en réduisant la surface d'échange.
2. des mécanismes compensatoires consommant de l'énergie et pouvant produire des contre-mouvements de soluté égaux aux pertes par diffusion [Mantel, L.H. et Farmer, L., 1983].

Le moyen le plus direct de réduire la diffusion de l'eau et des ions est de diminuer la concentration ionique de l'hémolymphe et par conséquent, le gradient osmotique entre le sang et le milieu extérieur. Les animaux présentant ce type de régulation sont dénommés osmoconformes. La concentration osmotique du sang suit plus ou moins rigoureusement celle du milieu extérieur dans les limites de tolérance de l'animal, mais cette diminution de l'osmolalité de l'hémolymphe, en

milieu dilué, provoque au niveau des tissus internes face à l'hémolymphe, l'apparition d'un flux d'eau et d'une prise de volume des cellules. Les osmoconformes régulent le volume de leur tissu en abaissant la concentration des solutés osmotiquement actifs, notamment le pool des acides aminés tissulaires. Les osmorégulateurs maintiennent une concentration interne hyperosmotique plus ou moins constante. La perte de sels provoquée par le gradient de pression osmotique sera compensée par une reprise d'eau importante à partir de l'urine, une réduction de la perméabilité de l'épithélium à l'eau ainsi qu'une prise de sels élevée à partir du milieu extérieur. On peut trouver deux types d'osmorégulateurs.

Les hyperosmorégulateurs vivent dans des eaux plus ou moins diluées. Ils sont confrontés à un problème d'entrée d'eau et de perte de sels. Pour cette raison, ils doivent minimiser la perméabilité à l'eau et absorber activement du NaCl à partir du milieu extérieur. C'est le cas du crabe Chinois *Eriocheir sinensis*.

Les hypoosmorégulateurs, par contre, maintiennent une osmolarité de l'hémolymphe inférieure à celle du milieu extérieur. Ces organismes perdent de l'eau et gagnent des ions. Ils contrecarrent cet effet en diminuant la production d'urine. C'est le cas du crabe *Pachygrapsus crassipes*.

Plusieurs structures épithéliales interviennent dans le contrôle des mouvements ioniques.

La paroi du tube digestif est un ensemble de cellules épithéliales dont certaines régions ont des fonctions bien spécifiques. Ainsi, la région médiane a essentiellement un rôle nutritif, d'absorption et de stockage des nutriments ainsi que de sécrétion d'enzymes protéolytiques. Tout au long de ce tube digestif, des cellules de type transporteur interviennent dans la prise d'ions et d'eau.

Les glandes antennaires ou organes rénaux interviennent dans l'osmorégulation, mais peu ou pas du tout dans l'ionorégulation. Les mouvements ioniques sont localisés dans l'épithélium du sac terminal dont l'ultrastructure est caractéristique d'un épithélium transporteur. Les glandes antennaires vont réabsorber le glucose et les acides aminés plutôt que le NaCl sauf chez les hyperrégulateurs d'eau douce.

L'action de ces organes semble insuffisante pour expliquer la régulation de l'osmolarité du sang. Les branchies apparaissent être le tissu le plus apte à effectuer ces compensations actives d'entrée du Na Cl [Mantel et Farmer, 1983].

1.1.2. Morphologie de la branchie

Depuis les expériences de Koch (1934), la fixation au nitrate d'argent est utilisée pour localiser les régions de la cuticule des arthropodes perméables au Cl⁻ et donc concernées dans le mouvement ionique. Cette technique, adaptée chez les crustacés, a permis l'identification de l'épithélium branchial comme site premier de la régulation ionique sanguine [Copeland 1968 - Barra et al, 1983]. Le crabe Chinois *Eriocheir sinensis* euryhalin hyperrégulateur présente une caractéristique assez remarquable : seules les trois branchies postérieures sont capables de fixer l'argent. Ces branchies postérieures seraient donc concernées dans le transport ionique et l'osmorégulation tandis que les branchies antérieures ne le seraient pas. Copeland (1964) avait également montré ce phénomène chez un autre crabe *Gecarcinus lateralis*.

Ces différences fonctionnelles sont confirmées par la mise en évidence de différences ultrastructurelles entre les deux types de branchies.

- L'épithélium des lamelles branchiales des branchies postérieures est plus épais (10 μm ou plus) que celui des branchies antérieures (2 - 4 μm).
- La cuticule des branchies postérieures est plus fine que celle des branchies antérieures (0,3 μm pour les branchies postérieures pour 1 μm pour les branchies antérieures).

(Voir Fig. 1).

Il est particulièrement important de souligner d'une part, la localisation des mitochondries ainsi que leur nombre et d'autre part, les invaginations aux faces apicales et basales de la cellule des branchies postérieures. Dans les branchies antérieures, les noyaux des fines cellules épithéliales font généralement saillie dans l'espace hémolympatique. Le côté apical des cellules possède très peu de replis, ce qui réduit le compartiment extracellulaire en-dessous de la cuticule. La quantité d'organelles intracellulaires est assez faible. La membrane plasmique ne montre pas de replis baso-latéraux. On considère que la fonction principale et essentielle de ce tissu (branchie antérieure) est la respiration. Pour les crabes acclimatés en eau douce, les branchies postérieures sont essentiellement caractérisées par un

réseau de replis apicaux évaginés et digités. Ces replis membranaires produisent un large et très caractéristique compartiment extracellulaire sous la cuticule. D'autre part, on peut observer également des replis profonds baso-latéraux venant se mettre en contact avec la membrane des mitochondries. Contrairement à ce qui s'observe dans la branchie antérieure, les mitochondries sont extrêmement abondantes et peuvent même remplir complètement l'espace cytoplasmique à l'intérieur et à l'extérieur de ces replis. Une structure similaire à celle décrite dans l'épithélium des branchies postérieures est mise en évidence chez de nombreux crustacés osmorégulateurs [Bielawski, 1971 - Copeland, 1968]. Cette structure est caractéristique d'un épithélium transporteur.

Il semble maintenant évident que le contrôle de l'osmolalité du sang chez le crabe *Eriocheir sinensis*, en eau douce, est essentiellement confiné aux trois paires postérieures de branchies.

Utilisant la méthode au nitrate d'argent, Copeland et Fitzjarrell (1968) ont remarqué une augmentation de la taille des branchies postérieures de crabes régulateurs hyperosmotiques après une acclimatation dans un milieu dilué. Si les crabes euryhalins sont acclimatés à l'eau douce, l'ultrastructure de l'épithélium de branchie antérieure reste similaire à la structure observée dans un milieu concentré. Le changement majeur a lieu pour l'épithélium de type transporteur de la branchie postérieure, un développement considérable du système de repli sur la face apicale est directement visible. Vingt-quatre heures après le transfert d'un crabe chinois de l'eau de mer à l'eau douce, quelques replis et vésicules apparaissent à la face apicale des branchies postérieures. Au-delà de vingt-quatre heures et jusqu'à quatre jours, le nombre de ces vésicules ainsi que leur taille vont en s'accroissant. (Fig. 2).

1.1.3. Physiologie de la branchie

On a pu établir que les flux de Na^+ dans les branchies antérieures isolées et perfusées du crabe *Eriocheir sinensis* sont essentiellement de types passifs [Pequeux et Gilles, 1981]. Cela n'empêche cependant pas l'observation de phénomènes pouvant réduire les pertes associées à ce flux passif. En effet, la perméabilité des branchies antérieures décroît aux faibles concentrations en Na^+ dans le milieu extérieur. Ceci est capital pour un organisme qui doit réduire les pertes de cet ion lors de l'acclimatation aux eaux de faible salinité.

Dans les branchies postérieures, l'entrée de Na^+ est essentiellement le résultat d'un transport actif et il est impossible d'y mettre en évidence un flux sortant de Na^+ . Krogh en 1938 proposa que la composante unidirectionnelle du flux de Na^+ consiste en un échange électroneutre avec NH_4^+ .

Ces échanges sont assez bien connus chez les poissons [Evans, 1977 et Payan, 1978]. Ce transport est souvent lié au transport et au métabolisme de l'ion NH_4^+ . Chez l'écrevisse, Shaw en 1960 a montré que la production de NH_4^+ varie avec la salinité du milieu d'acclimatation. On a pu établir une relation entre "l'influx" de Na^+ avec le flux sortant de NH_4^+ d'une part, et avec la concentration du milieu environnant d'autre part. Cette idée a été renforcée par le fait qu'une augmentation de NH_4^+ dans les tissus apparaît pour des acclimations en milieu dilué [Gerard et Gilles, 1972]. Les résultats obtenus par Pequeux et Gilles en 1981 sur des branchies isolées et perfusées d'*Eriocheir sinensis* soutiennent l'idée que le couplage entre les mouvements NH_4^+ et Na^+ peut se produire dans les branchies postérieures, mais celui-ci ne représente qu'une toute petite partie de l'influx total de Na^+ . Il existe une très grande différence entre le flux de Na^+ et celui de NH_4^+ .

La majeure partie de l'influx de Na^+ dans les branchies postérieures doit donc s'expliquer essentiellement, soit par un système électrogénique, soit par tout autre système d'échange où les ions H^+ seraient des candidats potentiels pour l'échange avec le Na^+ . Pour vérifier cette hypothèse, des études sont réalisées qui associent le transport d'ions avec la mesure de différence de potentiel électrique pour des branchies isolées et perfusées [Pequeux et Gilles, 1988]. La différence de potentiel électrique qui apparaît entre le milieu extérieur et le intérieur est due aux pompes ioniques qui occasionnent un flux d'ions. Cette différence peut être mesurée au moyen de deux électrodes au calomel reliées par un pont d'agar. L'électrode de référence est plongée dans la solution extérieure tandis que l'autre électrode est placée dans le récipient où est recueillie la solution de perfusion. Les deux électrodes sont connectées à un électromètre.

Chez le crabe *Eriocheir sinensis*, les trois paires de branchies postérieures ne sont pas électriquement semblables aux trois paires de branchies antérieures si l'animal provient d'un milieu dilué. (Voir tableau ci-dessous).

	Branchies antérieures		Branchies postérieures		
	4ème	5ème	6ème	7ème	8ème
DDP (mV)	+ 45,2	+ 24,8	- 26,6	- 25,5	- 16,3
±	±	±	±	±	±
S* (mV)	10,3	6,8	14,2	15,3	9,2

* : = écart-type.

[Pequeux et Gilles, 1988].

La DDP (différence de potentiel) varie en fonction de la concentration en Na Cl dans le milieu extérieur aussi bien pour les branchies postérieures que pour les branchies antérieures. (Voir tableau ci-dessous).

External [NaCl]	PD(mV) in	
	Anterior gills DDP ± S*	Posterior gills DDP ± S*
1	- 52.5 ± 2.4 (4)	11.1 ± 5.2 (4)
10	-38.3 ± 1.46 (6)	-25.1 ± 8.7 (4)
25	-11.1 ± 6.6 (7)	-23.9 ± 4.4 (4)
100	-1.7 ± 4.8 (7)	-27.0 ± 2.3 (4)
240	+26.0 ± 10.7 (22)	-20.9 ± 5.5 (16)

* : = écart-type.

[Pequeux et Gilles, 1988].

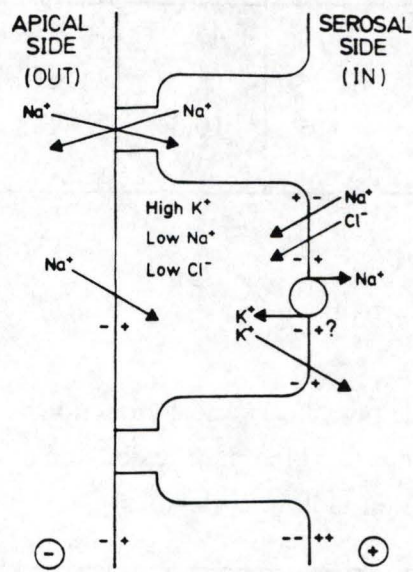


Fig. 3 : Modèle fonctionnel du transport de Na^+ , K^+ et Cl^- dans les branchies antérieures du crabe *Eriocheir sinensis* lorsque les deux côtés de l'épithélium sont baignés dans une même solution saline (isotonique à l'hémolymphe).

- Comment expliquer cette différence entre les branchies antérieures et postérieures dans un même milieu ?
- Quelle peut-être la cause d'une telle variation lorsque la concentration en Na Cl se modifie ?

a. Les branchies antérieures.

En l'absence de gradients de concentration d'ions, la DDP entre le milieu extérieur et le milieu intérieur, pour les branchies antérieures est toujours positive, variant de + 6 à + 60 mV. Les changements de DDP induits par des substitutions ioniques spécifiques peuvent s'expliquer par plusieurs composantes diffusibles tel Na^+ , K^+ et Cl^- . A la face sérosale de l'épithélium (séparant le contenu cellulaire de l'hémolymphe), un potentiel de diffusion pour le K^+ et le Cl^- est partiellement court-circuité par le potentiel de diffusion du Na^+ . Une (Na - K) ATPase a été mise en évidence sur cette face. A la face apicale, la DDP est générée principalement par la diffusion du Na^+ . Le modèle présenté par Pequeux et Gilles en 1988 explique les résultats obtenus après substitution de certains ions par diverses substances. (Fig. 3).

b) Les branchies postérieures

Les branchies postérieures baignées de part et d'autre de faces par une solution saline qui empêche la formation d'un gradient transépithélial de NaCl, indiquent une différence de potentiel toujours négative de -5 à -50 mV. La DDP peut être expliquée en considérant les mouvements de diffusion du Cl^- à la face apicale et les mouvements de K^+ court-circuités par le Cl^- à la face sérosale [Pequeux et Gilles, 1988]. La perméabilité de l'épithélium au Na^+ est extrêmement faible. Cependant, les branchies postérieures de *Eriocheir sinensis* sont connues pour être le site d'un processus de transport actif de Na^+ indépendant de celui du Cl^- qui modifie la DDP [Pequeux et Gilles, 1981]. L'application d'inhibiteurs de transport lors de la perfusion de branchies et lors de la mesure de DDP donnent une indication sur les mécanismes impliqués dans ces processus. Le S.I.T.S. (4 acétamido - 4' isothiocyantostilben - 2 - 2' disulfonic acide) induit une dépolarisation essentiellement lorsqu'il est additionné au milieu externe. Cette expérience supporte l'idée qu'un transporteur $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ est impliqué dans le mouvement d'entrée de Cl^- à la face apicale de l'épithélium.

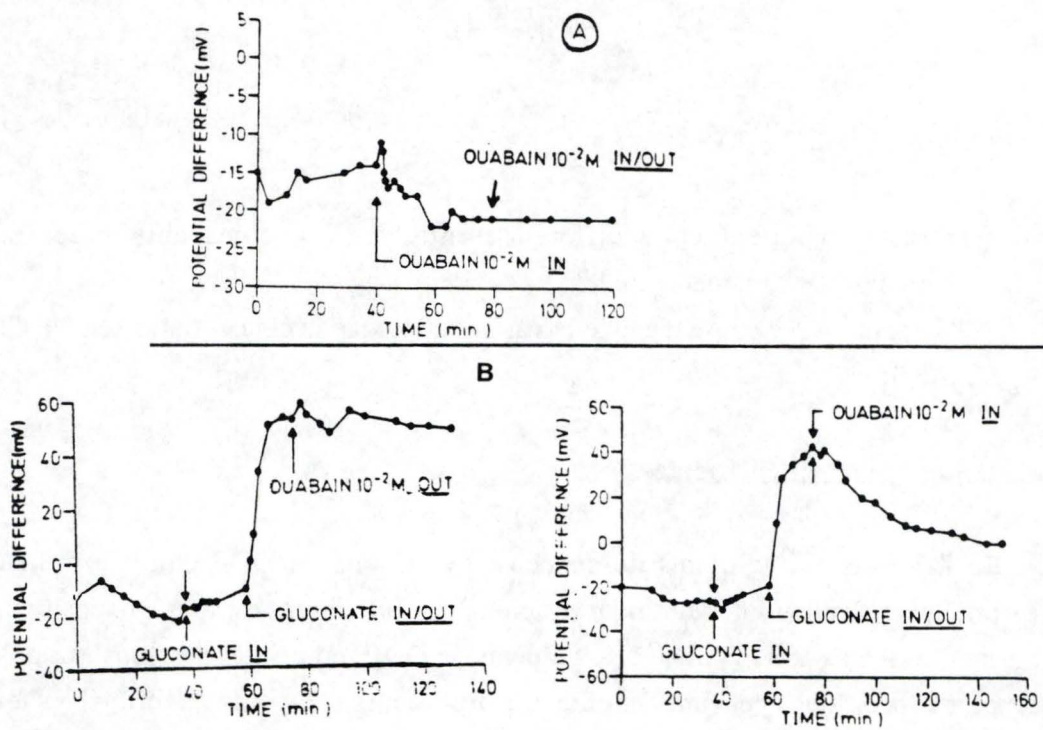


Fig. 4 : Effet de l'ouabaine 10^{-2} M sur la différence de potentiel électrique transépithéliale des branchies postérieures, isolées et perfusées, du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

A : addition de l'ouabaine dans la solution saline extérieure ("out") et dans le milieu de perfusion ("in").

B : addition de l'ouabaine dans la solution saline extérieure ("out") et dans le milieu de perfusion ("in") dans lesquels le Cl^- est remplacé par du gluconate.

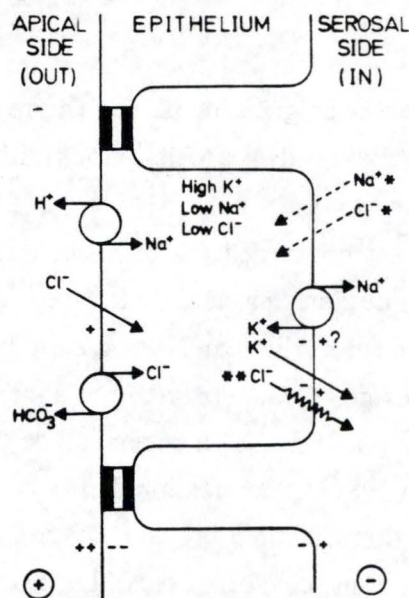


Fig. 5 : Modèle fonctionnel du transport de Na^+ , K^+ et Cl^- dans les branchies postérieures, isolées et perfusées, du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

Les deux côtés de l'épithélium sont baignés dans la même solution saline (Ringer "eau douce").

* : La diffusion passive du Na^+ et Cl^- à la face sérosale ne joue pas un rôle significatif dans l'établissement de la différence de potentiel électrique.

** : Les mouvements "sortant" de Cl^- à la face sérosale sont liés au potentiel de diffusion du K^+ .

Considérons maintenant les mouvements de Na^+ : ils sont modifiés par l'amiloride. En milieu gluconate, utilisé comme substitut du Cl^- , l'amiloride placé dans le milieu extérieur, a pour effet d'amener une brusque dépolarisation. Cela permet d'affirmer qu'un transport sensible à l'amiloride se trouve à la face apicale de la cellule et que le mouvement de Na^+ en est dépendant. Puisque l'échange $\text{Na}^+ / \text{NH}_4^+$ ne joue pas un rôle significatif dans la capture des ions Na^+ , la part essentielle de l'entrée active de Na^+ à la face apicale de la branchie postérieure est probablement due à un transporteur $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ sensible à l'amiloride.

En outre, une $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase a pu être mise en évidence à la face sérosale de la branchie. Cet enzyme est inhibée par l'ouabaïne. Lorsque l'ouabaïne est additionnée dans le milieu baignant la branchie (milieu "out"), aucune modification n'apparaît. Par contre, lorsque ce produit est ajouté dans le milieu de perfusion (milieu "in"), une hyperpolarisation est visible (Fig. 4). En présence de gluconate à la place du Cl^- , cet effet est nettement plus marqué. Une dépolarisation apparaît montrant bien l'inhibition de la $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase et donc du flux de Na^+ . Cette disparition du flux occasionne une dépolarisation. Le modèle ci-contre permet de résumer les observations précédentes [Pequeux et Gilles, 1988]. (Fig. 5).

1.1.4. Biochimie de la branchie

Plusieurs évidences supportent l'idée que le transport actif du Na^+ est étroitement lié à l'activité enzymatique de la $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase. La présence de cette $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase dans les branchies de crabes a été démontrée par plusieurs auteurs [Neufeld et al. 1980 - Pequeux et al., 1983 - Towle et al., 1976].

L'enzyme dans les branchies des crustacés est similaire à celle trouvée chez les vertébrés. Elle requiert absolument des ions Mg^{++} , Na^+ et K^+ et elle est inhibée par l'ouabaïne. Chez le crabe *Eriocheir sinensis*, une activité $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase élevée caractérise l'épithélium branchial de type transporteur, c'est-à-dire celui des branchies postérieures où l'activité de cet enzyme est plus élevée que dans les branchies antérieures [Pequeux et al., 1984].

On a pu prouver que la différence enzymatique entre branchies antérieures et postérieures n'est pas le résultat d'une différence dans la structure de l'enzyme, mais pourrait être liée à la morphologie de la branchie. L'épithélium des branchies postérieures possède plus de sites de transport ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase dans la partie baso-latérale de la cellule épithéliale. [Barra et Pequeux, 1983 - Pequeux et Gilles, 1988].

On a également pu démontrer qu'une acclimatation des crabes *Eriocheir sinensis* à des salinités réduites provoque une augmentation importante de l'activité ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase uniquement dans les branchies postérieures. Chez le crabe Chinois, l'augmentation la plus importante de l'activité spécifique apparaît après 48 heures d'acclimatation à l'eau douce. [Pequeux et al., 1984]. L'augmentation d'activité observée serait liée à un accroissement de la quantité de ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase à la face baso-latérale ou à une activation d'enzymes préexistants. Notons que par ailleurs, une augmentation de l'activité due à une synthèse d'un nouvel enzyme a été observée chez *Artemia salina* [Conte et al., 1977]. Au niveau de l'ultrastructure des branchies, on constate une mise en place progressive (3 à 8 jours) d'une nouvelle structure épithéliale de type transporteur uniquement au niveau des branchies postérieures lorsque le crabe *Eriocheir sinensis* est placé en eau douce.

Il est clair cependant qu'une acclimation à court-terme est nécessaire pour résoudre ce problème de régulation ionique en eau douce. Towle et ses collaborateurs en 1976 montrent une augmentation très rapide de la ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase lors du transfert du crabe bleu d'eau de mer en eau douce. Ils suggèrent que cette adaptation rapide est la conséquence d'une activation de la ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase. L'activation de l'enzyme peut avoir deux causes : une augmentation de la vitesse de pompage de la ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase d'une part et, l'activation de pompes de réserve d'autre part [Almeida, A.F., 1985]. La phosphorylation par la PKc de la ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ATPase augmente son activité [Greene et Lattimer, 1986]. Cette activation nécessite de l'ATP (source énergétique de la phosphorylation). L'ATP utilisé doit donc être reformé pour permettre un fonctionnement continu des pompes ioniques. Comment va-t-il être reformé ?

En 1970, Schoffeniels et Gilles démontrent que les besoins énergétiques nécessaires pour l'acclimatation à différents milieux dépendent essentiellement du métabolisme oxydatif, lui-même fonction de la consommation d'oxygène. En

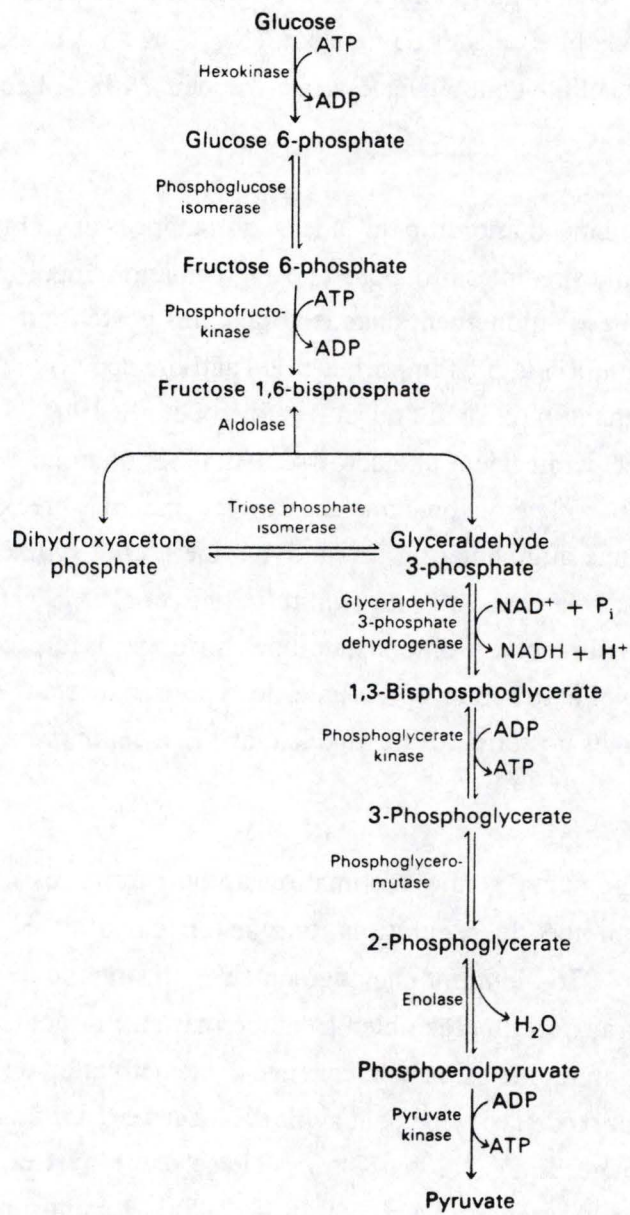


Fig. 6 : Voie glycolytique ou voie d'Embden-Meyerhof.

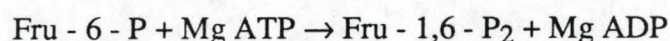
1929, Schlieper indique que la respiration du *Carcinus maenas* augmente avec la diminution de la salinité du milieu environnant. L'augmentation de la consommation d'oxygène est principalement due à une demande accrue d'énergie pour le processus de régulation ionique. Au niveau des crabes *Carcinus maenas* et *Eriocheir sinensis*, il est établi que le contenu en adénylates dans les branchies postérieures est deux fois supérieur à celui des branchies antérieures autant en milieu de haute et basse salinité. Le transport ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) est bien couplé au pool d'adénylates. La quantité d'ATP intracellulaire ainsi que son "Turn over" varie avec l'origine de la branchie isolée.

Le rapport ATP / ADP est nettement plus faible dans les branchies postérieures pour des crabes acclimatés dans une eau douce que dans l'eau de mer, tandis que ce rapport n'évolue pas ou peu pour les branchies antérieures [Wanson et al., 1983].

Ces résultats mettent en exergue la nécessité d'une optimisation du métabolisme des adénylates dans les branchies postérieures lors d'une faible demande en énergie. Dans l'eau de mer, le processus de transport est arrêté et la demande énergétique est faible.

Inversément, dans un milieu dilué, la demande en énergie s'accroît dans les branchies postérieures, car l'activité transportrice est plus élevée. La consommation d'ATP est supérieure à la production d'ATP et la charge énergétique en adénylates diminue.

La fermentation anaérobie représente le mécanisme le plus primitif, mais aussi le plus répandu de production d'énergie et d'ATP. Cette production se réalisera à partir du glucose ou de ses dérivés. La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof est l'ensemble des réactions qui transforment le glucose en pyruvate (Fig. 6). Cette dégradation du glucose produira de l'ATP à raison de deux molécules d'ATP par molécule de glucose. On peut remarquer que les réactions de la glycolyse sont toutes réversibles sauf celles catalysées par l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. Celles-ci représentent trois étapes propices à la régulation. Un enzyme va retenir tout particulièrement notre attention dans cette voie d'Embden-Meyerhof : la phosphofructokinase. La phosphofructokinase catalyse la réaction suivante :



L'enzyme est un tétramère d'un poids moléculaire d'environ 340.000 composé de plusieurs types de sous-unités : il existe plusieurs isoenzymes. On peut caractériser cinétiquement la PFK par l'inhibition par un excès d'ATP et la forme sigmoïde de leur courbe de saturation pour le Fru - 6- P. Ces deux effets peuvent disparaître sous l'effet de régulateurs allostériques positifs. Le 5'-AMP peut faire disparaître cette inhibition par l'ATP en se liant à un site spécifique différent de celui de l'ATP.

La présence de ces deux sites permet d'expliquer le rôle important de cette enzyme. Elle ajuste la mobilisation énergétique aux dépenses et maintient la quantité de nucléotides à haute énergie. Une grande quantité d'AMP liée à une dépense énergétique élevée va activer cette enzyme pour la production d'ATP. Il a été démontré que la PFK de mammifère peut être phosphorylée de manière réversible [Hofer H.W., 1985]. Plusieurs protéines kinases sont capables de phosphoryler la PFK : les protéines kinases dépendantes du AMP [Hofer, H.W., 1985], les protéines kinases dépendantes du Ca^{++} /phospholipides (protéine kinase C) [Hofer et al., 1985], les protéines kinases dépendantes du Ca^{++} et de la calmoduline [Mieskes et al., 1987] et les tyrosine kinases [Sale et al., 1987].

Chez les mammifères, cette phosphorylation ne semble pas avoir beaucoup d'effet sur les propriétés cinétiques de cette enzyme. La phosphorylation de la PFK dans les érythrocytes humains, a été détectée ; toutefois, aucune modification des propriétés cinétiques de la PFK n'a pu être observée [Lagrange et al., 1985]. L'enzyme PFK musculaire du lapin est phosphorylable par la protéine kinase C. Ceci affecte ses propriétés allostériques. La courbe de saturation pour le Fructose-6-P en temps normal est sigmoïde et lors de la phosphorylation, cette courbe voit sa forme sigmoïde se modifier et sa V_{max} augmenter légèrement [Hofer, H.W. et al., 1985].

Chez les invertébrés, la phosphorylation de la PFK induit des modifications plus importantes de ses propriétés.

Chez l'*Ascaris suum*, la phosphorylation de la PFK musculaire catalysée par les protéines kinases A, purifiées à partir du coeur de boeuf, augmente l'activité catalytique de l'enzyme d'un facteur trois ou quatre. Chez cet animal, la phosphorylation de la PFK est considérée comme un des modes de régulation prépondérant du métabolisme énergétique des hydrates de carbone [Kulkarni et al., 1987]. Chez la douve *Fasciola hepatica*, la sous-unité catalytique de la protéine

kinase A phosphoryle la PFK. Les changements cinétiques obtenus sont similaires à ceux observés par des effecteurs positifs tel l'AMP. L'activité catalytique de l'enzyme est assez nettement augmentée [Kamemoto et Mansour, 1986].

La signification physiologique de cette régulation de la PFK par la phosphorylation est actuellement encore discutée, mais il est à remarquer que les enzymes des processus de dégradation sont habituellement activées par phosphorylation et inactivées par déphosphorylation tandis que des enzymes, incluses dans des voies de biosynthèse, sont inactivées par phosphorylation et activées par déphosphorylation.

1.1.5. Conclusions

Les branchies de crabes *Eriocheir sinensis* sont un modèle intéressant pour l'étude des mouvements d'ions transépithéliaux dans le cadre du contrôle de l'osmorégulation chez les crustacés :

- Ce modèle d'organisation structurale et fonctionnelle de la branchie est quasiment unique. L'importance du système transporteur dans les branchies postérieures d'*Eriocheir sinensis* permet d'étudier le processus de transport d'ions seul mais aussi la relation structure - fonction dans un épithélium transporteur.
- La prise active de sels dans les branchies postérieures implique une consommation énergétique qui peut être régulée par divers processus (rappel de la phosphorylation PFK) et une régulation d'activité contrôlée par des pompes ioniques. Mais ces variations de salinité affectent un ensemble de cellules et la réponse de celles-ci doit être identique et coordonnée. Dès lors, un système de transduction est nécessaire pour qu'un stimulus extérieur puisse pénétrer dans la cellule et engendrer une réponse.

1.2. L'importance de l'ion Ca^{++} dans la communication cellulaire

1.2.1. Introduction

Il est nécessaire pour un organisme pluricellulaire, qu'une coordination s'effectue entre les activités des différentes cellules ; les signaux chimiques permettront cette régulation. Cependant, la plupart des signaux extérieurs ne peuvent pénétrer l'obstacle que représente la membrane plasmique. Dès lors, un mécanisme de transduction est nécessaire. Le messenger primaire agit sur un récepteur et celui-ci matérialisera les signaux externes en signaux internes ou messagers secondaires. Du point de vue moléculaire, cette suite d'évènements se déroule grâce à diverses protéines intramembranaires qui transmettent chacune l'information en induisant une modification conformationnelle d'une autre protéine.

On connaît déjà trois voies de communication intracellulaire :

- 1- la première qui génère l'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) comme messenger secondaire.
- 2- la seconde qui emploie le guanosine monophosphate cyclique (GMP_c) comme messenger secondaire.
- 3- la dernière avec comme messagers secondaires :
 - les ions Ca^{++}
 - le diacylglycérol
 - l'inositol triphosphate.

Ces trois voies de communication ont de nombreux points communs et la première molécule de cette suite d'activation est un récepteur situé à la surface de la cellule. Ce récepteur va transmettre l'information par l'intermédiaire de la famille des protéines G. Celles-ci ne sont actives que lorsqu'elles sont liées au GTP. Dans les trois voies, la protéine G active une enzyme amplificatrice située sur la face interne de la membrane. Cette enzyme transforme un précurseur en messenger secondaire. Le messenger secondaire induira une modification de la structure de certaines protéines cellulaires soit en liant à celles-ci, soit en se activant des protéines kinases qui phosphoryleront d'autres protéines provoquant un changement de configuration de ces protéines.

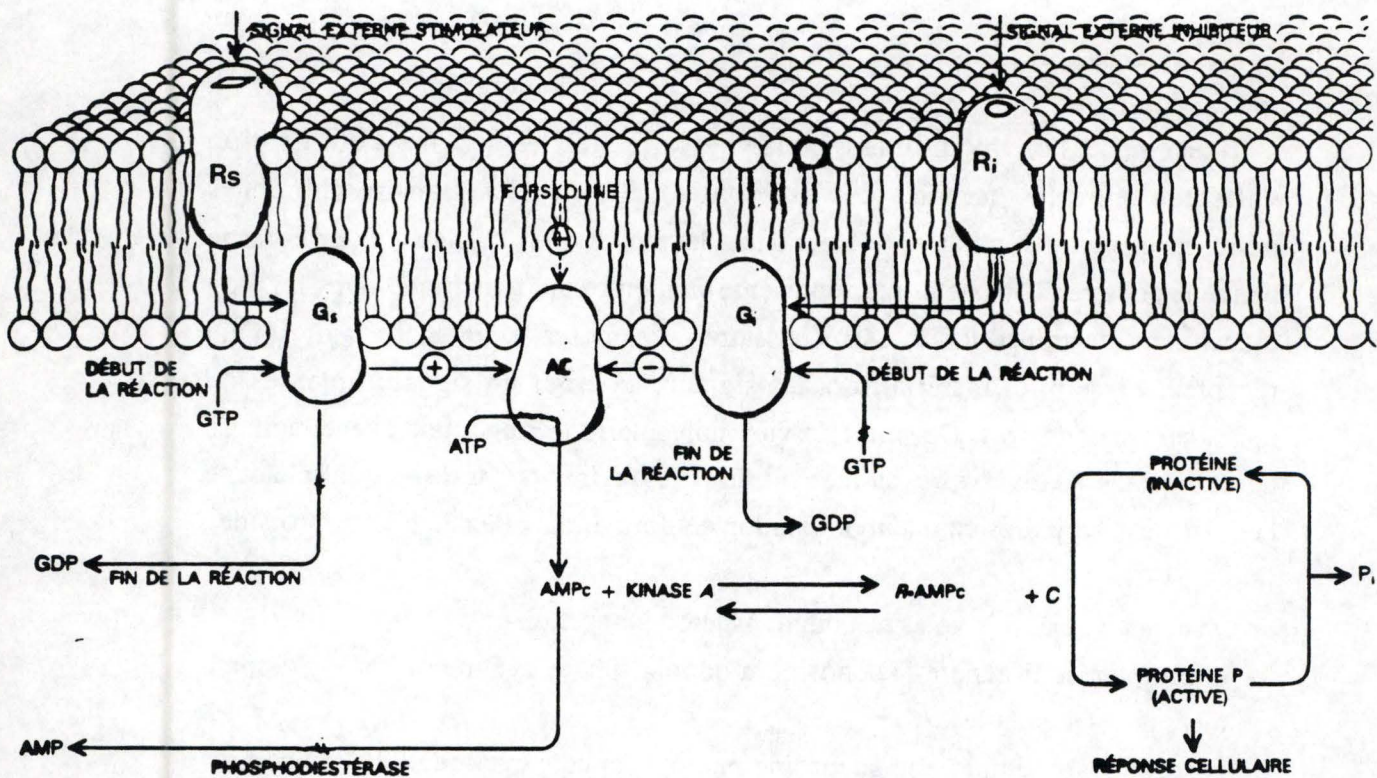


Fig. 7 : Modèle d'activation ou d'inhibition de la protéine kinase A.

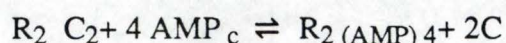
- (Ri) : récepteur inhibiteur (Rs) : récepteur stimulateur
 (Gi) : protéine G inhibitrice (Gs) : protéine G stimulatrice
 (Ac) : adénylate cyclase

1.2.2. La voie de l'AMP cyclique.

En 1970, Gilman décrivit les mécanismes agissant au niveau de la production d'AMP_c. (Fig. 7).

Il existe deux types de protéines G intervenant sur l'adénylate cyclase. L'une a un effet stimulateur (G_s), l'autre un effet inhibiteur (G_i). Ces deux protéines G, ayant des effets antagonistes, se lient à leur récepteur respectif suivant la stimulation qui apparaît au niveau de la membrane cellulaire. La fixation du récepteur sur la protéine G induit une modification de celle-ci qui peut alors fixer un GTP et être active. La protéine G_s (s comme activateur) va activer l'adénylate cyclase et une protéine G_i va inhiber cette adénylate cyclase. L'adénylate cyclase catalysera la formation d'AMP_c à partir d'ATP. L'activité du complexe G_s-GTP ou G_i-GTP cesse lorsque le GTP est hydrolysé en GDP grâce à une GTPase.

Les étapes finales de cette voie d'activation s'effectuent grâce à une protéine kinase A. Celle-ci est composée de quatre sous-unités : deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques. Sous cette forme, l'enzyme est inactif. Lorsque le taux d'AMP_c augmente, ce dernier se lie aux deux sous-unités régulatrices de ce tétramère affectant la liaison entre l'unité catalytique et l'unité régulatrice. Cela provoque une dissociation de l'holoenzyme suivant le schéma ci-dessous :



R = sous-unité régulatrice

C = sous-unité catalytique

La libération de l'unité catalytique de la PKa (Protéine kinase A) permettra la phosphorylation d'un certain nombre de substrats.

C'est la séquence primaire entourant un résidu sérine (Ser) ou un résidu thréonine (Thr) qui détermine si une protéine peut être phosphorylée ou non par la PK_a.

Pour la sérine, la séquence doit être la suivante :

- 1) Lys - Arg - x - x Ser
- 2) Arg - Arg - x - Ser

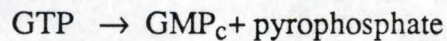
Pour la thréonine, la séquence d'acides aminés nécessaire est reprise ci-dessous :

Arg - Arg - Arg - Arg - Thr.

1.2.3. Le système du GMP cyclique

Ce système est encore assez mal connu.

Le GMP_c est synthétisé par l'enzyme guanylate cyclase dont l'action est semblable à celle de l'adénylate cyclase.



Le GMP_c va agir sur la protéine kinase G qui, à partir de l'ATP, peut phosphoryler un certain nombre de protéines sur des résidus sérines et thréonines suivis d'un résidu basique. La structure des protéines kinases activées par le GMP_c est analogue à celles des protéines kinases activées par l'AMP_c si ce n'est que, la sous-unité régulatrice ne se dissocie pas de la sous-unité catalytique si elle est activée [Lincoln et al., 1978]. Cette guanylate cyclase peut être activée par l'acide arachidonique et le phosphatidyl inositol [Kikkawa, U. et al. 1986].

1.2.4. Voie d'activation par le Ca⁺⁺ (messager secondaire).

Il est établi que le Ca⁺⁺ joue un rôle important de régulation dans de nombreux processus cellulaires. Dans la cellule au repos, la concentration de Ca⁺⁺ du cytoplasme est très faible ($2 \cdot 10^{-7}$ M) alors qu'à l'extérieur de la cellule, celle-ci est de $1,3 \cdot 10^{-3}$ M. La membrane plasmique n'étant pas totalement imperméable au Ca⁺⁺, le gradient important déterminera une entrée d'ions Ca⁺⁺ évaluée à 4 nmoles/min. Cet influx de Ca⁺⁺ sera contrebalancé par l'activité d'une pompe à Ca²⁺ qui est une Ca²⁺-Mg²⁺ATPase membranaire. Il existe également une

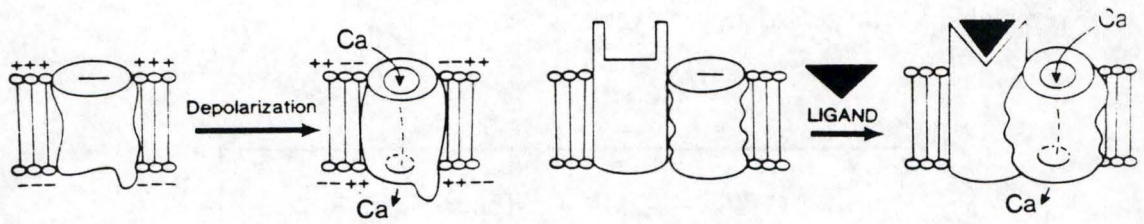


Fig. 8 : Modèle hypothétique de deux types de canaux pour le calcium contrôlés par des mécanismes dépendants du courant électrique ou de récepteurs.

Ca^{++} ATPase au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries. Sous l'influence de divers stimuli, le Ca^{++} peut entrer dans la cellule ou être libéré des zones de stockage et la concentration de cet ion s'accroît dans le cytoplasme. Il exerce à ce moment les propriétés de second messenger.

Différents types de canaux Ca^{++} sont connus et ceux-ci se différencient fondamentalement au niveau des mécanismes qui contrôlent leur ouverture et leur fermeture.

Certains canaux sont dépendants d'un stimulus électrique ("Voltage dependent") et répondent donc à une dépolarisation appropriée de la membrane. Cette catégorie de canaux est composée de plusieurs sous-classes qui diffèrent dans leur sensibilité au courant électrique, leurs propriétés cinétiques et leur sensibilité à des substances pharmacologiques. [Fox, Nowycky et Tsien, 1987 - a et b] (Fig. 8). Un signal occasionne une brusque dépolarisation qui provoque l'ouverture du canal.

La seconde catégorie de canaux au Ca^{++} opère par un mécanisme dépendant de récepteurs. Divers récepteurs peuvent être associés à ces canaux Ca^{++} [Bolton, 1979]. Le ligand (stimulus) agit sur le récepteur provoquant ainsi une modification de celui-ci et permet l'ouverture du canal et donc l'entrée du Ca^{++} .

Il est assez curieux qu'un ion minéral, ne présentant pas une structure particulière, puisse servir de second messenger intracellulaire. Il est utile d'observer que la fixation d'un ion bivalent comme le Ca^{++} peut provoquer des modifications de conformation de certaines protéines activatrices comme par exemple la calmoduline [Altin, J.C. et Bygrave, F.L., 1988].

La calmoduline fut découverte à la fin des années 60. On retrouve la calmoduline dans tout le règne animal ainsi que dans tous les tissus. Cette protéine a un poids moléculaire de 16.273 et est composée de 148 acides aminés. Une molécule de calmoduline capture quatre molécules de calcium en présence de concentrations physiologiques en Mg^{++} et en potassium. Il existe quatre sites spécifiques pour le Ca^{++} . Les quatre sites, pouvant lier l'ion calcium. Ils représentent une boucle de douze acides aminés.

La calmoduline est une molécule qui agit sur un ensemble de processus cellulaires. Cette protéine normalise le niveau des nucléotides cycliques par l'activation de la phosphodiesterase de l' AMP_c et par la stimulation de l'adénylate cyclase. La sensibilité de ces deux enzymes au calcium diffère. Aux faibles concentrations en Ca^{++} , l'adénylate cyclase est activée tandis que des concentrations cytosoliques élevées inhibent l'adénylate cyclase et activent la phosphodiesterase AMP_c ramenant

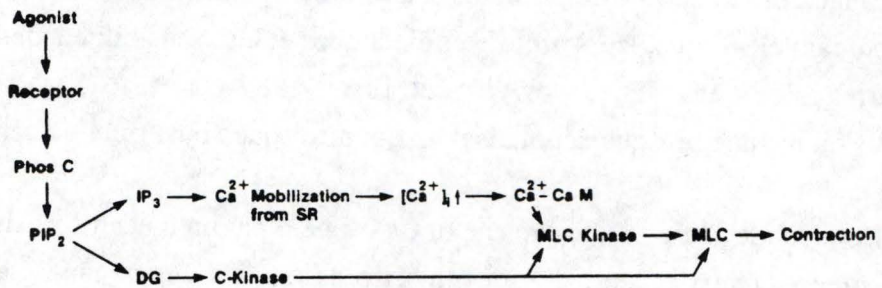


Fig. 9 : Schéma représentant l'action en synergie de deux composés, provenant de l'hydrolyse de l'inositol diphosphate, sur la contraction musculaire.

le niveau d'AMP_c intracellulaire à son niveau d'équilibre. La calmoduline peut interagir en synergie avec le système de la protéine kinase C : notamment au niveau de la contraction des muscles lissés. [Fig. 9].

Un activateur se lie au récepteur activant une phospholipase C qui hydrolyse le PIP₂ (phosphatidyl inositol diphosphate) en IP₃ (inositol triphosphate) et en DG (diacylglycérol). L'IP₃ mobilise les réserves de Ca⁺⁺ du réticulum endoplasmique augmentant donc la concentration du calcium intracellulaire. Le Ca⁺⁺ se lie à la calmoduline et ce complexe peut activer la "myosine light chain" kinase qui phosphoryle la "myosine light chaîne" (MLC) entraînant une contraction musculaire. Le DG (diacylglycerol), lui aussi, active la protéine kinase C qui phosphoryle la MLC kinase laquelle à son tour phosphoryle la MLC provoquant une contraction. Cette myosine phosphorylée a la capacité d'activer l'actine, ce qui provoque la contraction musculaire.

Le Ca⁺⁺ ainsi que la calmoduline jouent un rôle important dans le contrôle du transport ionique. La calmoduline semble inhiber la (Na⁺ - K⁺) ATPase. La présence du Ca⁺⁺ et de la calmoduline est indispensable pour voir apparaître une action physiologique d'inhibition de la (Na⁺ - K⁺) ATPase. Cet effet a pu être mis en évidence sur un extrait brut de (Na⁺ - K⁺) ATPase de coeur de rat ainsi que sur des globules rouges.

Des expériences ont pu montrer que l'inhibition par la calmoduline n'est pas directe, mais se réalise via l'interaction avec la calnaktine (un inhibiteur de la (Na⁺ - K⁺) ATPase) [Huang et Askari, 1982]. En 1983, Powis et ses collaborateurs ont mis en évidence une inhibition de la (Na⁺ - K⁺) ATPase par d'importantes concentrations en Ca⁺⁺ (> 10 μM) au niveau du cerveau de rat. L'addition d'EDTA au milieu, diminuant le Ca⁺⁺ interne de 1 - 2 μM à 0,3 μM, entraîne une augmentation de l'activité de (Na⁺ - K⁺) ATPase d'environ 200 % [Powis, 1985]. Ce même effet apparaît en présence de la calmoduline avec une augmentation de 50 % de l'activité de cet enzyme. Le Ca⁺⁺ semble jouer un rôle d'inhibiteur de l'(Na⁺ - K⁺) ATPase et dès lors, les composés qui peuvent diminuer la quantité de Ca⁺⁺ interne vont activer cette (Na⁺ - K⁺) ATPase ; c'est bien l'effet observé par la calmoduline et l'EDTA. Le calcium intervient également dans l'activation d'un autre système : celui la protéine kinase C.

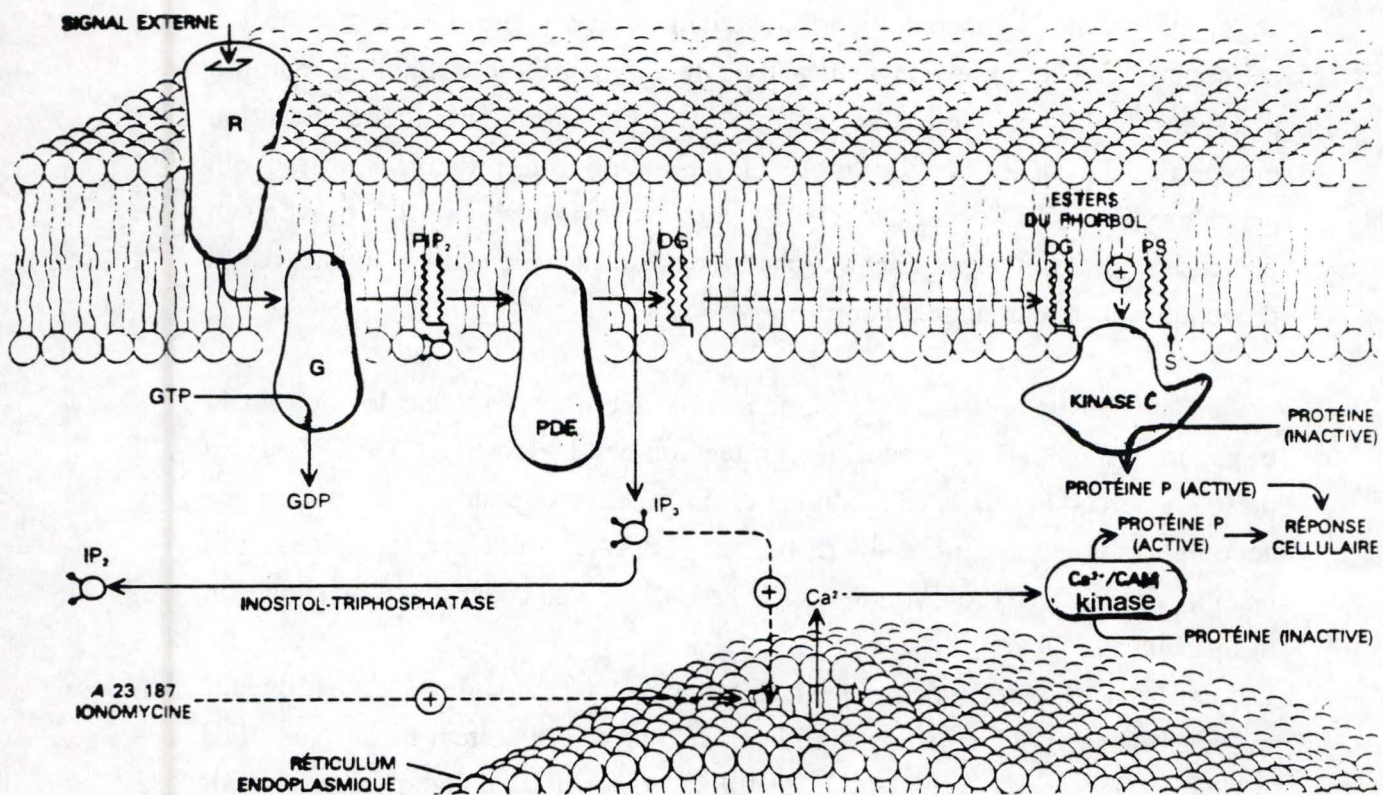


Fig. 10 : Modèle d'activation de la protéine kinase C.

- | | | |
|---|--|---------------------------|
| (R) : récepteur | (G) : protéine G | (PDE) : phosphodiesterase |
| (PIP ₂) : Phosphatidyl inositol diphosphate | (IP ₃) : inositol triphosphate | |
| (DG) : diacylglycérol | (Ca M) : calmoduline | |

1.3. La Protéine Kinase C (PK_C)

1.3.1. Introduction

Les phospholipides inositol ont attiré fortement l'attention des chercheurs qui étudient l'activation des fonctions cellulaires et la prolifération des cellules. Au moyen d'hormones, de neurotransmetteurs ou d'autres substances biologiquement actives, ils ont pu induire la dégradation de phospholipides générant des messagers secondaires intracellulaires dont le système d'activation est indépendant de l'AMP_C. Le lien entre des phospholipides inositol et l'activation des récepteurs en surface de la cellule est reconnu pour la première fois par Hokin et Hokin (1953) qui montrent une incorporation rapide de P³² dans le phosphatidyl inositol (PI) et l'acide phosphatidique dans des tranches de pancréas activées par l'acétylcholine. Durel et al. (1969) suggèrent que ce "Turn over" des phospholipides intervient dans le phénomène de transduction et Michell en 1975 propose l'idée que cette destruction des phospholipides permette l'ouverture du canal à Ca⁺⁺. En 1984, Berridge et ses collaborateurs montrent que l'inositol triphosphate, un des premiers produits de l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate (PIP₂), sert de médiateur lors de la libération de Ca⁺⁺ à partir des réserves internes. D'autre part, il est démontré que le 1,2 diacylglycérol, autre produit de l'hydrolyse du PIP₂, demeure dans la membrane et provoque l'activation de la protéine kinase C, kinase identifiée pour la première fois en 1977 par Takai et al. On retrouve cet enzyme dans tous les tissus. Il est particulièrement concentré dans le système nerveux et joue probablement un rôle important dans la transmission synaptique [Kikkawa, U. et al., 1982]. Sa large distribution laisse penser qu'il joue un rôle primordial de contrôle et de modulation dans beaucoup de processus biologiques.

1.3.2. Propriétés physico-chimiques.

Un des aspects les plus intéressants de la biologie de la PK_C est son mécanisme d'activation. (Fig. 10). L'activation de la protéine kinase C est, au départ, identique à celle de la protéine kinase dépendante de l'AMP_C. Un stimulus extérieur active un récepteur et le modifie ; ce récepteur se lie à une protéine G qui, à cet instant, voit elle aussi sa structure se modifier. La protéine G va s'adjoindre un GTP et activer un autre enzyme. C'est à ce stade qu'apparaît une dissociation du mécanisme d'activation de la PK_C et de la PK dépendante de AMP_C. Cette protéine G activée influence une phospholipase C (ou phosphodiesterase selon les auteurs). Cet

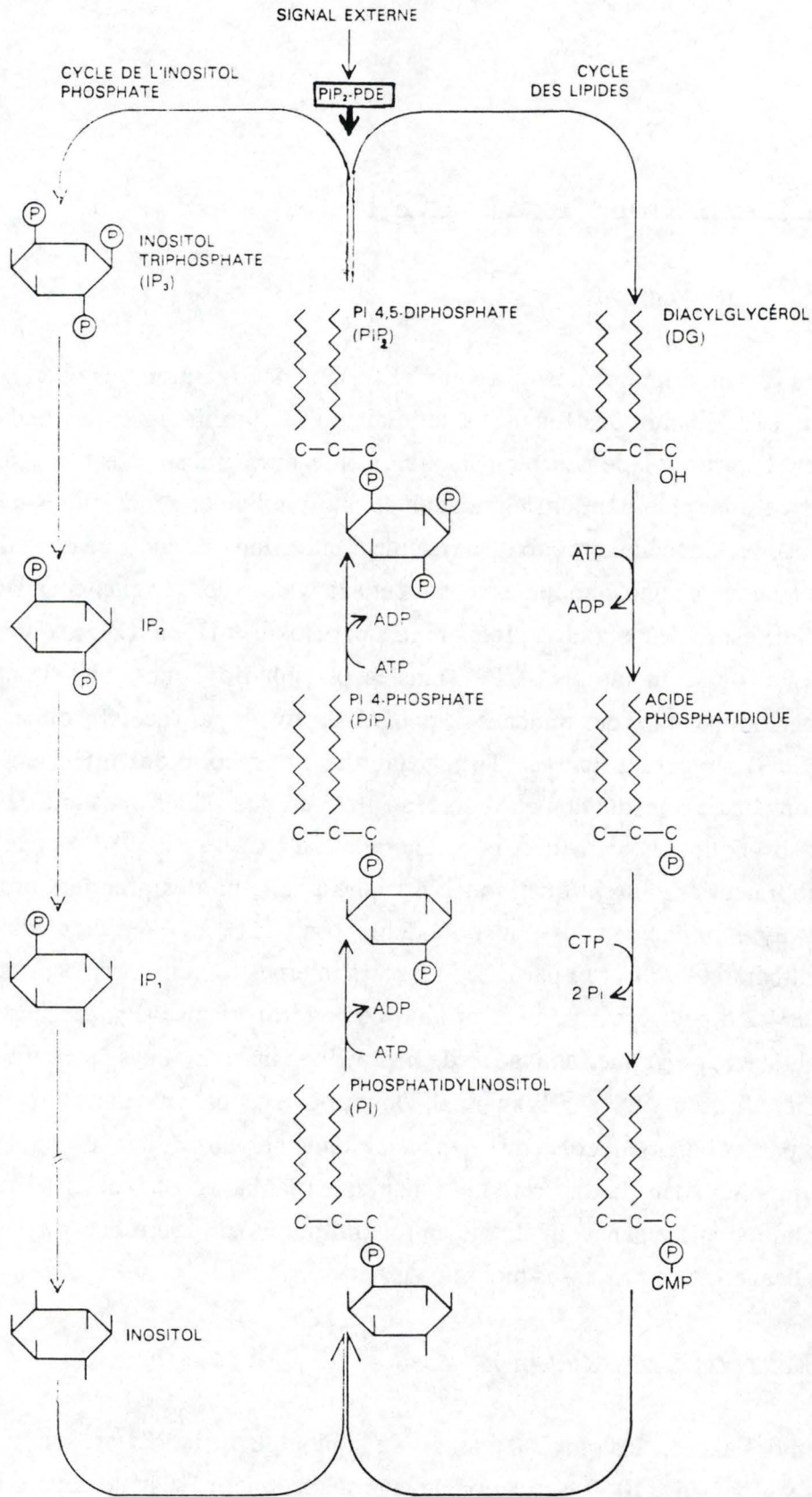


Fig. 11 : LE CYCLE DES INOSITIDES réapprovisionne le stock de seconds messagers fabriqués à partir d'inositides. Les messagers externes agissent par l'intermédiaire de l'enzyme PIP₂ - phosphodiesterase, qui décompose le PIP₂ en DG et IP₃, deux seconds messagers. Ceux-ci subissent ensuite une séquence de réactions chimiques qui leur permettent de se lier pour former du phosphatidylinositol (PI) et, enfin, redonner du PIP₂. Le déroulement du cycle requiert la présence continue d'ATP et de cytosine triphosphate (CTP), sources de groupes phosphate (Pi).

enzyme va hydrolyser le phosphoinositol diphosphate (PIP₂) en deux messagers secondaires :

- le diacylglycérol (DG)
- l'inositol triphosphate (IP₃)

Ces deux composés agissent à deux endroits et sur deux mécanismes différents.

L'inositol triphosphate (I_{1,4,5} P₃) est un messager intracellulaire intervenant dans la mobilisation du Ca⁺⁺. Il pourrait agir sur les réserves internes de Ca⁺⁺ probablement celles du réticulum endoplasmique par l'interaction avec un récepteur à la surface de ce dernier. La concentration de Ca⁺⁺ dans le cytoplasme augmente du fait de la sortie de Ca⁺⁺ du réticulum endoplasmique. Cette augmentation provoque une série de réponses cellulaires dont l'activation de la protéine kinase C.

Le diacylglycérol reste membranaire et amène une translocation de la PK_C du cytoplasme vers la membrane. Dans des conditions de non-stimulation, plus des deux tiers de la PK_C se retrouve cytosoluble et inactive. La PK_C se lie au diacylglycérol et doit s'adjoindre nécessairement de la phosphatidyl sérine et du Ca⁺⁺(stimulé par l'IP₃) pour être activée. A ce moment, la protéine kinase C peut phosphoryler des protéines membranaires ou cytosolubles.

Ce système doit pouvoir revenir dans sa position d'origine, c'est-à-dire s'inactiver. L'inositol triphosphate (I_{1,4,5}P₃), une fois produit, va très vite disparaître. (Fig. 11). Le mécanisme principal permettant d'arrêter l'action de ce messager secondaire consiste au retrait du phosphate en position 5 par l'action d'une phosphatase spécifique [Berridge et Irvine, 1984]. L'IP₃ va être déphosphorylé jusque l'inositol pour permettre la formation d'un nouveau phosphoinositol avec le diacylglycérol.

Il existe toutefois plus d'un mécanisme amenant la concentration intracellulaire en Ca⁺⁺ à un niveau requis pour une activation totale de la fonction cellulaire puisque la présence de Ca⁺⁺ extracellulaire est souvent essentiel pour susciter des réponses physiologiques [Ushio Kikkawa et Yasutomi Nishizuka, 1986]. Dans tous les cas, le signal Ca⁺⁺ est passager dans beaucoup de tissus et retourne rapidement au niveau basal.

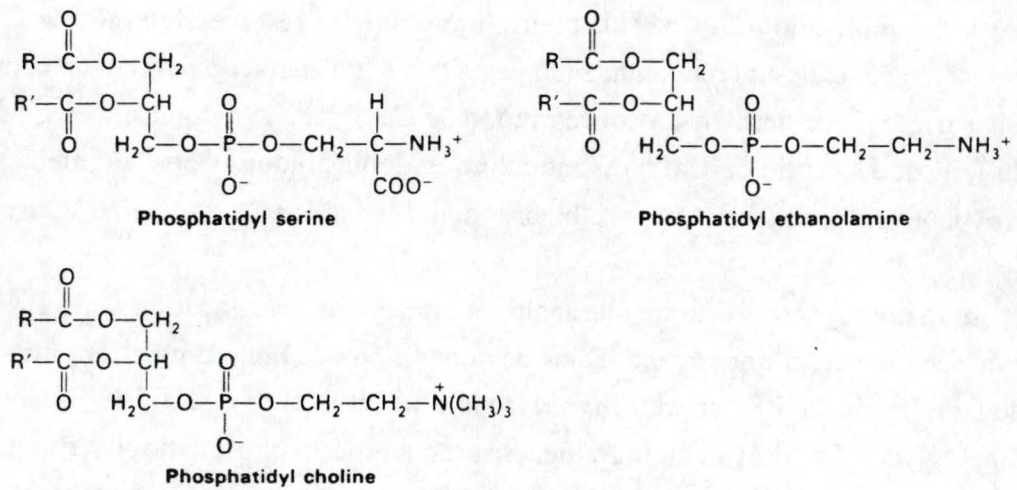


Fig. 12 : Structure de divers phospholipides.

Le diacylglycérol est normalement absent des membranes cellulaires. Quand le récepteur est stimulé, ce lipide neutre apparaît passagèrement dans la membrane et disparaît après quelques secondes ou une minute au plus. Des études biochimiques indiquent que cette disparition rapide est due à deux phénomènes :

- 1) sa conversion rapide en phospholipide inositol par le chemin de l'acide phosphatidique.
- 2) sa dégradation ultérieure en acide arachidonique qui à son tour peut générer d'autres messagers tels que les prostaglandines.

La PK_C est activée peu de temps après la stimulation du récepteur et, est inactivée rapidement avec la disparition du diacylglycérol et probablement avec la dégradation protéolytique de la kinase elle-même. Malgré tout, la conséquence de cette phosphorylation peut perdurer en fonction de la stabilité biologique du phosphate attaché de manière covalente sur chaque substrat protéique. La PK_C phosphoryle les résidus thréonine et sérine de la protéine.

Les interactions phospholipides - kinase n'apparaissent pas être de nature hautement spécifique. On suppose que la PS (phosphatidyl sérine) est le lipide endogène qui interagit avec la PK_C mais d'autres acides lipidiques peuvent lui être substitués. Les interactions avec le diglycéride sont stéréospécifiques et stoechiométriques. Etudions d'un peu plus près ces interactions.

1.3.3. Interactions des phospholipides avec la PK_C

Dans des conditions physiologiques, il apparaît absolument nécessaire que la phosphatidyl sérine (PS) soit présente pour activer la PK_C. Ni la phosphatidylcholine (PC), ni la phosphatidyl éthanolamine (PE) ne peuvent activer seul la PK_C. (Fig. 12). La nature du groupement acyl gras de la PS ne semble pas être importante. C'est le groupement carboxylique de la PS qui joue le rôle important dans l'activation. De ce fait, d'autres composés tel que le lipide A et ses dérivés, l'acide arachidonique et les autres longues chaînes acides gras insaturés peuvent activer la PK_C en absence de phospholipides. Ces diverses expériences permettent d'affirmer que l'interaction lipide - kinase n'est pas spécifique, mais est néanmoins essentielle.

1.3.4. Interactions PK_C - diglycérade.

La PK_C est activée en présence de diacylglycérol dans la membrane. Cette liaison augmente l'affinité de la PK_C pour le Ca⁺⁺. Si l'interaction est de nature spécifique, il doit être possible de trouver un antagoniste spécifique de l'enzyme. Seul le S n 1,2 diacylglycérol est un activateur de la PK_C ; le Sn 2,3 diacylglycérol ainsi que le S n 1,3 diacylglycérol ne sont pas capables d'activer la PK_C [Boni et al., 1985] ; [Rando R.R. et Young N., 1984]. Cette stéréospécificité suggère un mode d'interaction hautement spécifique entre le diglycérade activateur et la kinase, du moins envers le squelette diglycérade. Les diglycérades endogènes qui activent la PK_C sont connus pour contenir un acide gras saturé en position 1 et un acide gras en position 2. Les chaînes alkyl doivent procurer une hydrophobicité suffisante pour permettre au diacylglycérol de se dissoudre dans la membrane d'une manière appropriée. Par exemple, aussi bien le 1-oleyl - 2 acetylglycérol que le 1 - acetyl - 2 oleylglycérol peuvent activer la PK_C. Ce manque relatif de spécificité envers les côtés alkyl des chaînes contraste avec la spécificité directe pour le squelette glycérol où toute modification entraîne une diminution de l'activité ou même une disparition de celle-ci.

- L'addition d'un seul carbone au squelette glycérol entraîne une diminution de l'activité de plus de 50 %.
- L'addition de deux carbones ou plus a comme effet d'inactiver ces composés.
- Des glycérades en anneaux rigides sont totalement inactifs.

La plus grande partie de la spécificité de la liaison est dirigée par les parties hydrophiles des diglycérades. Des modifications des rédisus hydrophiles telles que le remplacement du 3 - hydroxyl affectent fortement la liaison. Toutes ces observations mettent bien en valeur le côté spécifique de l'interaction diglycérade - PK_C.

Puisque les seconds messagers IP₃ et diacylglycérol peuvent transmettre le signal du récepteur à la cellule, l'activation d'une phospholipase spécifique du PIP₂ est une étape cruciale du transfert transmembranaire. On observe que les phospholipases C sont assez hétérogènes du point de vue de leur poids moléculaire, de leur dépendance au calcium, de leur optimum de PH et de leur point isoélectrique pour des tissus différents [Hirasawa, Irvine et Dawson, 1982]. Il semble que deux formes de phospholipases C existent, l'une associée aux membranes et l'autre cytosoluble.

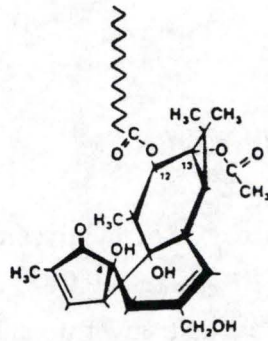


Fig. 13 : Structure du PMA (Phorbol - 12 - myristate - 13 - acétate).

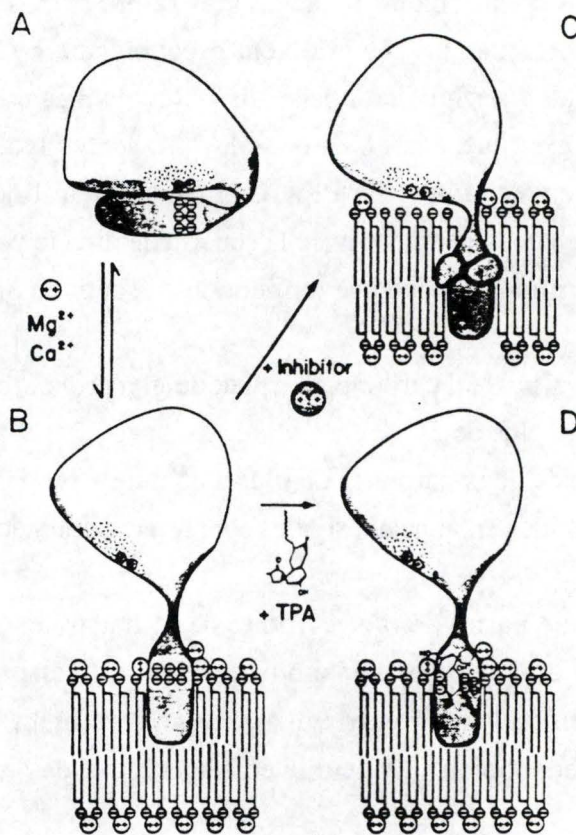


Fig. 14 : Représentation schématique des deux domaines de la protéine kinase C et leur rôle dans l'activation et l'inhibition de l'enzyme.

- A** : Le site actif (aire en pointillée) est caché par l'unité régulatrice.
- B** : En présence de cations bivalents et de phospholipides, le domaine lipophile (unité régulatrice) s'insère dans la membrane laissant libre le site actif.
- C** : Les inhibiteurs de la PKc délogent les cations bivalents entraînant une modification structurale de l'enzyme et une disparition du site actif.
- D** : Les phorbols esters tels que le TPA se lient au domaine lipophile et activent la protéine kinase C.

Une des caractéristiques les plus fondamentales de la PK_C est son activation par les esters de phorbol ou promoteurs de tumeur. Ceux-ci activent directement la protéine kinase C autant *in vivo* qu'*in vitro*. [Nishizuka, 1986].

L'ester de phorbol le plus souvent utilisé est le PMA (Phorbol 12 - Myristate 13 - Acétate). (Voir fig. 13). Le PMA active la PK_C sans l'intervention du Ca⁺⁺ et du diacylglycérol mais un certain taux de Mg⁺⁺. L'activation par le PMA persiste beaucoup plus longtemps que pour le diacylglycérol, car le PMA n'est pas hydrolysé aussi rapidement que le diacylglycérol. Pourtant, les esters de phorbol n'ont pas d'homologie avec les diglycérides, [Jefrey A.M. - Liskamp R.J.M, 1986]. Il existe donc deux sites distinctes de liaison sur la PK_C: un pour les promoteurs de tumeurs, l'autre pour les diglycérides. Ces deux sites sont très proches, car la liaison des diglycérides sur la PK_C et la liaison des esters de phorbol sur la kinase s'excluent mutuellement.

1.3.5. Structure de la PK_C

Le poids moléculaire de cet enzyme est d'environ 80 k Da. La PK_C est composée d'une simple chaîne de polypeptides, qui peut être dissociée en deux domaines fonctionnels différents pouvant être séparés par une protéase thiol dépendant du Ca⁺⁺. [Kikkawa et al., 1982]. Le premier domaine (30 k Da) est hydrophobique et peut se lier à la membrane. Sur cette unité, le diacylglycérol, les phospholipides et les esters de phorbol peuvent se fixer. Cette unité a une fonction régulatrice. Le second domaine (50 k Da) est actif en l'absence de Ca⁺⁺, de P S et de diglycérides. Il est hydrophilique et représente donc l'unité catalytique. Ces deux domaines sont reliés par une simple chaîne de polypeptides qui va pouvoir se déformer.

En l'absence des composés lipophyliques (PS / diglycérides), la sous-unité catalytique est bloquée par la sous-unité régulatrice qui couvre le site de réaction de la PK_C. Quand la kinase se lie aux phospholipides et aux Ca⁺⁺, la sous-unité lipophile s'insère dans la double couche lipidique de la membrane. A ce moment la sous-unité catalytique est accessible aux substrats. Les ions Ca⁺⁺ neutralisent les charges - à la surface de la membrane. (voir Fig. 14).

Un des aspects les plus intéressants du point de vue structurel est l'existence d'isoenzymes ayant des poids moléculaires très proches mais distincts. Trois formes d'isoenzymes désignés types I, II et III selon leur ordre d'élution sur une colonne d'hydroxy apatite avec un gradient de K_3PO_4 ont été isolées dans le cerveau du rat [Huang et al., 1986] et du singe [Huang et al., 1987]. Ces PK_c sont encodées par trois gènes distincts [Parker R.J. et al., 1986]. La distribution différente de ces trois isoformes a été démontrée dans plusieurs tissus [Huang et al., 1987]. Le type I, seul présent dans le cerveau, est retrouvé dans le cerebellum, dans la rétine, la glande pinéole et les PMN neutrophiles. Le type II, présent également dans les tissus périphériques, est particulièrement enrichi dans le cortex cérébral. Le type d'isoenzyme III est spécialement bien représenté dans le bulbe olfactif (absent des tissus périphériques).

1.4. Phosphorylation et rôle de la PKc

L'osmorégulation chez les crustacés est un phénomène actif nécessitant de l'énergie. La $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$, une des nombreuses pompes ioniques est régulée par la phosphorylation. Qu'est-ce que la phosphorylation ?

1.4.1. La phosphorylation

La plupart des phénomènes de transduction décrits brièvement précédemment sont catalysés par une réaction qui constitue le mécanisme le plus universel de la régulation biologique : la phosphorylation. En 1949, Sutherland utilise déjà le terme de phosphoprotéine pour des protéines sur lesquelles un phosphore est lié par un lien ester aux hydroxyamino acides telle que la sérine ou la thréonine. A la même époque, il est également démontré que la phosphorylase existe sous deux formes appelées : phosphorylase a et phosphorylase b. La phosphorylase b nécessite pour être observée une importante concentration de 5'-AMP ; cette forme est dite inactive.

La phosphorylase a par contre est active et phosphorylée. On prouve aussi que ces deux formes de phosphorylase sont interconvertibles dans la cellule ; cette modification représente donc un mode de régulation physiologique assez remarquable.

Dix ans plus tard, Earl Sutherland montre qu'un enzyme est nécessaire dans la phosphorylation et la déphosphorylation de cet enzyme. L'enzyme catalysant la phosphorylation est appelé phosphorylase kinase et l'enzyme catalysant la déphosphorylation est la phosphorylase phosphatase. De plus, la phosphorylase kinase subit également une phosphorylation pour être active et l'AMP cyclique intervient dans ce processus. La phosphorylation de la phosphorylase incorpore un groupement phosphate sur la sérine 14 très proche du groupement N - terminal de la protéine qui comporte 841 résidus. Cet apport provoque la formation de trois nouveaux ponts ioniques sur la phosphorylase.

En 1968, Walsh découvre que l'enzyme qui catalyse la phosphorylation et, par conséquent, l'activation de la phosphorylase kinase est une protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique. En considérant le processus général de phosphorylation et de déphosphorylation, il est clair que ce processus doit être

activé ou inhibé pour avoir une action de régulation. Les niveaux relatifs de protéines kinases et de phosphatases exerceront un contrôle de ce phénomène.

Le nombre de protéines phosphorylées est très élevé, mais les réactions ne sont catalysées que par un nombre restreint de protéines kinases.

Les plus connues sont :

- 1) la protéine kinase A dépendante de l'AMPc
- 2) la protéine kinase G dépendante du GMPc
- 3) la protéine kinase C
- 4) la protéine kinase dépendante de la calmoduline.

Pour que la phosphorylation de la protéine contrôle une activité physiologique, il est nécessaire que la liaison covalente du phosphate avec la protéine induise des modifications conformationnelles du substrat protéique entraînant un changement fonctionnel.

Quelle peut-être la signification biologique de ces phosphorylations de protéines ?

On décrit le contrôle allostérique comme une régulation rapide et passagère tandis que la phosphorylation est perçue comme beaucoup plus lente à plus durable [Krebs, 1985]. La régulation allostérique contrôle principalement les signaux provenant de la cellule, tandis que le phénomène de phosphorylation et déphosphorylation des protéines est largement concerné par le transfert d'informations de l'extérieur vers l'intérieur. D'autre part, les phosphorylations sont beaucoup plus fréquentes chez les cellules d'Eukaryotes que chez les cellules de Procaryotes. Au niveau des cellules d'Eukaryotes où la complexité des organismes est considérable, une communication entre les cellules est particulièrement importante.

1.4.2. La phosphorylation par la protéine kinase c

La protéine kinase C offre une large spécificité de substrats lorsqu'elle est testée *in vitro*. L'enzyme phosphoryle les résidus thréonyl et séryl mais pas les résidus tyrosyl des protéines endogènes. Il faut de plus que les résidus sérines possèdent des acides aminés basiques du côté C-terminal. Comme la plupart des protéines kinases, l'enzyme se phosphoryle en présence de diacylglycérol, Ca^{++} et de phospholipides. La signification de cette autophosphorylation n'est cependant pas encore connue. La protéine kinase C et la protéine kinase A (dépendant de l'AMPc) relayent les informations, provenant de l'extérieur vers l'intérieur, pour permettre une réponse cellulaire ; ces 2 enzymes provoquent apparemment des réponses cellulaires similaires. Des analyses récentes ont

Substrate proteins

- Receptor proteins
 - Epidermal growth factor receptor
 - Insulin receptor
 - Somatomedin C receptor
 - Transferrin receptor
 - Interleukin-2 receptor
 - Nicotinic acetylcholine receptor
 - β -adrenergic receptor
 - Immunoglobulin E receptor
- Membrane proteins
 - Ca^{2+} -transport ATPase
 - Na^+/K^+ ATPase
 - Na^+ channel protein
 - Na^+/H^+ exchange system
 - Glucose transporter
 - GTP-binding protein
 - HLA antigen
 - Chromaffin granule-binding protein
 - Synaptic B50 (F1) protein
- Contractile and cytoskeletal proteins
 - Myosin light chain
 - Troponin T and I
 - Vinculin
 - Filamin
 - Caldesmon
 - Cardiac C-protein
 - Microtubule-associated proteins
- Enzymes
 - Glycogen phosphorylase kinase
 - Glycogen synthase
 - Phosphofructokinase
 - β -Hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase
 - Tyrosine hydroxylase
 - NADPH oxidase
 - Cytochrome P450
 - Guanylate cyclase
 - DNA methylase
 - Myosin light chain kinase
 - Initiation factor 2
- Other proteins
 - Fibrinogen
 - Retinoid-binding proteins
 - Vitamin D-binding protein
 - Ribosomal S6 protein
 - GABA modulin
 - Stress proteins
 - Myelin basic protein
 - High-mobility group proteins
 - Middle T antigen
 - pp60^{src} protein

Fig. 15 : Diverses protéines phosphorylées par la protéine kinase C
(Nishizuka, Y., 1986).

montré que la PKc et la PKa partagent souvent le même résidu phosphorylable ainsi que les mêmes protéines acceptrices de groupements phosphates [Kishimoto et al. , 1985]. Le site de phosphorylation dépend fortement de la proximité de certains résidus pour que le substrat soit reconnu. Un grand nombre de protéines sont phosphorylables par la PKc (Fig. 15). Greene et Lattimer en 1986 montrent la phosphorylation directe de la (Na⁺ - K⁺)-ATPase dans les nerfs de lapin. Une diminution de l'activité de la (Na⁺ - K⁺)-ATPase apparaît dans les nerfs de lapin diabétique et cette décroissance reflète une réduction de l'activité de la protéine kinase C. Des antagonistes de la protéine kinase C (PMA et OAG) permettent une normalisation de l'activité de l'(Na⁺ - K⁺)-ATPase. La phosphorylation de la (Na⁺ - K⁺)-ATPase a été mise en évidence par incorporation de ³²P sur cette enzyme.

1.4.3. Les rôles physiologiques de la PKc dans la réponse cellulaire

La protéine Kinase C est largement distribuée dans tous les organes et son rôle s'étend à un grand nombre de système et un grand nombre d'espèces animales.

a) Action de la PKc chez les vertébrés.

La PKc agit sur les pompes ioniques. En 1986, Lynch et ses collaborateurs montrèrent une stimulation de la (Na⁺ - K⁺)-ATPase dans les hépatocytes. Dans les hépatocytes de rat, la pompe (Na⁺ - K⁺) est stimulée par la norepinephrine, la vasopressine (AVP) et l'angiotensine II [Berthon et al. , 1984]. Ces trois hormones mobilisent la Ca⁺⁺ interne et produisent le diacylglycérol. Lynch et ses collaborateurs affirment que la stimulation par l'AVP est due à la production de diacylglycérol plutôt qu'à l'augmentation de la concentration de Ca⁺⁺ car l'incubation de cellules en présence d'EGTA ne diminue pas l'effet stimulant de l'AVP sur les pompes ioniques. Les effets activateurs de l'AVP et du PMA (ester de phorbol) ne sont pas additifs car l'AVP agit par la production de diacylglycérol et celui-ci a un site d'activation sur la PK_c très proche du PMA.

En 1987, Hootman et ses collaborateurs montrent dans les cellules des acini du pancréas l'effet de la PK_c. L'ester de phorbol et le diacylglycérol (activateurs de la PK_c) doublent l'activité de la pompe (Na⁺ - K⁺). L'ionophore (A23187) augmente aussi l'activité de la (Na⁺ - K⁺)-ATPase d'environ 30 %. L'effet de l'ionophore (A23187) et de l'ester de phorbol (TPA : 12 - 0 - tetradecanoylphorbol - 13 acétate) sont additifs. Dans les acini du pancréas, l'ester de phorbol (TPA) et le diacylglycérol accroissent le taux

d'ouabaine liée or celui-ci est proportionnel à l'activité de la pompe $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)\text{-ATPase}$ [Hootman et al. , 1987].

Ces effets ont été mis en évidence dans des synaptoneurones de cerveau. [Gusovsky, F., 1986].

Weiman et Shenolikar (1986) ont pu mettre en évidence la présence de la protéine kinase C dans le tissu rénal à la fois dans le cytosol et dans les membranes plasmiques. Les membranes des reins, à bordure en brosse, contiennent un transporteur électroneutre qui échange le sodium pour l'hydrogène. Ce transport Na^+/H^+ , inhibé par l'amiloride, est activé par le TPA (activateur de la PKc). Le TPA accroît également l'entrée de glucose dans ces cellules car il existe un cotransport $\text{Na}^+/\text{glucose}$. L'absence d'ATP dans les cellules ne permet pas l'activation de la PKc par le TPA. Cette activation du transport Na^+/H^+ par les activateurs de la PKc a également été observé dans les plaquettes sanguines [Siffert et Akkerman, 1988]. Les esters de phorbol et les diglycérides entraînent une augmentation du pH interne par l'intermédiaire de l'activation du transport Na^+/H^+ . Il s'agit d' un processus important d'initiation spécifique des fonctions des plaquettes, c'est-à-dire changement de forme, formation d'agrégats et excrétion de divers produits intervenant dans la coagulation. L'activation des plaquettes par divers agonistes occasionne une augmentation du Ca^{++} interne. Cet accroissement du Ca^{++} cytosolique stimulerait le transport Na^+/H^+ par l'intermédiaire de la PK_c.

Si un activateur de plaquettes influence un récepteur, celui-ci agit sur la phospholipase c qui active la dégradation du PIP_2 en diacylglycérol (DG) et inositol triphosphate (IP_3). Le DG activerait la PK_c et l' IP_3 mobiliserait le Ca^{++} pour cette activation. La PK_c entraînerait une alcalinisation du milieu intracellulaire par activation de Na^+/H^+ . Ce transport activerait l'entrée de Ca^{++} . L'augmentation importante du Ca^{++} interne activerait la phospholipase A₂ permettant la formation de thromboxane A₂.

Dans des cellules en culture BALB/C 3T3, l'activation de la PK_c par le TPA (ester de phorbol) et le diacylglycérol induisent une inhibition du cotransport $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, la prise de 2-deoxyglucose et enfin l'activation de l'ornithine carboxylase [O'Brien, T.G. et al., 1988].

Tous ces flux d'ions dus à des transports actifs utilisent de l'énergie. Il est primordial pour la cellule de pouvoir restaurer ses réserves. La PK_c intervient dans la voie glycolytique où la phosphofructokinase (enzyme essentiel pour la dégradation du glucose) peut être phosphorylée changeant les propriétés allostériques de l'enzyme [Hofer, H.W.

et al., 1985]. Cette voie glycolytique permet la restauration des réserves énergétiques en formant deux molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose.

La PKc intervient également dans d'autres systèmes physiologiques. Kaibuchi (1983) observe, sur des plaquettes sanguines de lièvre, une libération de sérotonine ainsi que d'enzymes lysosomiaux, tels que la N-acétylglucosaminidase (NAGase), pour de hautes concentrations en thrombine ou en collagène dans le milieu. Lorsque ces plaquettes sont stimulées par ces deux facteurs, le diacylglycérol (activateur de la PKc) est produit de façon rapide et passagère. Une activation de la PKc s'ensuit, observée par la phosphorylation d'un substrat endogène de 40 k Da. Cette stimulation provoque également une augmentation passagère de Ca^{++} cytosolique. L'addition d'un activateur de la PKc, l'OAG (1-oleyl-2-acetyl-glycérol), et d'un ionophore (A 23187) entraîne la même réaction que celle produite par la thrombine : une libération de sérotonine et d'enzymes lysosomiaux dont la NAGase. Ces deux composés doivent être appliqués simultanément pour obtenir une réponse.

Une libération d'histamine a pu être observée dans les PMN basophiles ainsi que dans les mastocytes par les activateurs de la PKc, le diacylglycérol ou le TPA (ester de phorbol) [Katakami, Y. et al., 1984].

La PKc joue également un rôle dans le système endocrinien.

La sécrétion d'aldostérone dans les cellules des glomérules rénaux est contrôlée par un facteur hormonal : l'angiotensine II. Elle produit une augmentation rapide de la sécrétion d'aldostérone qui se maintient tant que l'angiotensine est présente. Cette hormone ne peut agir qu'en présence de Ca^{++} extracellulaire et son action est bloquée par des inhibiteurs de canaux calciques. L'incubation de cellules en présence d'ionophore (A 23187) induit une sécrétion d'aldostérone, représentant 30 à 40 % de la quantité maximale induite par l'angiotensine II. Le TPA (ester de phorbol activateur de la PKc) accroît également la sécrétion d'aldostérone d'une valeur identique à l'augmentation provoqué par l'ionophore (A 23187). L'addition du TPA et de l'ionophore (A 23187) ensemble, produit une réponse similaire à celle induite par l'angiotensine II. En perfusant avec le 4-phorbol-12,13-didecanoate, ester de phorbol non actif, aucune sécrétion d'aldostérone n'apparaît, montrant bien l'effet spécifique du TPA sur la PKc [Kojima, I. et al., 1983].

En 1984, Delbeke et ses collaborateurs ont mis en évidence un effet de la prolactine sur des cellules en culture de la glande pituitaire.

La libération de calcitonine (substance endocrine) est aussi régulée par la PKc dans des cellules en culture de la thyroïde [Hishikawa, R. et al., 1985]. Il est aussi possible d'observer une stimulation de la libération d'insuline dans les îlots du pancréas par un effet combiné des esters de phorbol et d'ionophores (A 23187) [Zawalich, W. et al., 1983].

La PKc intervient également dans le contrôle de sécrétions exocrines. L'effet combiné de l'ester de phorbol (TPA) et de l'ionophore (A 23187), activateurs de la PKc, stimule la sécrétion de pepsinogène par les glandes gastriques isolées du chimpanzé [Sakamoto, C. et al., 1985].

La sécrétion d' α -amylase par le pancréas est également stimulée en présence des activateurs de la PKc et d'un ionophore [Merrit, J.E. et Rubin, R.P., 1985].

La PKc semble jouer aussi un rôle sur le système nerveux où on observe une libération de dopamine par les cellules PC 12 lorsqu'elles sont incubées en présence de divers activateurs de la PKc avec un ionophore [Pozzan, T. et al., 1984].

Le TPA induit une contraction du muscle vasculaire lisse isolé de lapin en présence de l'ionophore (A 23187) [Rasmussen, H. et al., 1984].

L'addition d'esters de phorbol sur des adipocytes de rat isolés provoque une stimulation du transport de D-glucose. Le TPA inhibe l'effet stimulateur de l'insuline sur le transport de glucose ; il inhibe également la liaison à haute affinité de l'insuline sur les adipocytes. Ces résultats permettent de supposer que la PKc est le lien fonctionnel entre le récepteur à l'insuline et l'activateur du transport de glucose.

Ces différents mécanismes agissent à court terme ; cependant, on a démontré que la PKc induit des phénomènes à long terme. L'activation de la PKc et la mobilisation du Ca^{++} interviennent sur l'expression de gènes et la prolifération des cellules. Ces deux phénomènes sont essentiels et agissent en synergie pour activer la synthèse de DNA dans les macrophages situés en périphérie [Kaibuchi et al., 1985]. Pour stimuler une prolifération rapide des cellules, des facteurs de croissance sont nécessaires et constituent un signal additionnel aux deux précédents. Par exemple, l'interleukine 1 utilise à la fois le Ca^{++} et la PKc pour induire la prolifération de lymphocytes T, en initiant l'expression du gène du récepteur interleukine 2 et en facilitant le relargage de l'interleukine 2 [Shackelford, D.A. et Trowbridge, I.S., 1984]. L'ester de phorbol, activateur de la PKc, et les facteurs de croissance agissent de concert pour stimuler la prolifération des cellules.

Pour citer un exemple : la présence conjointe de l'insuline et du TPA est nécessaire pour activer la croissance de la lignée cellulaire Swiss 3T3 [Rosengurt, E. et al., 1984]. Les promoteurs de tumeur sont connus pour induire l'expression du gène de l'ornithine décarboxylase [Otani, S. et al., 1985] de la sérotonine N - acétyl transferase [Zatz, M., 1989] et d'autres substances également. Toutes ces observations ont été réalisées sur tissus ou cellules en culture de vertébrés uniquement. Existe-t-il une régulation similaire pour les invertébrés ?

b. Action de la PKc chez les invertébrés

Dans une lignée de cellules d'insecte en culture, le PMA (Phorbol 12 - Myristate - 13 - Acétate) en présence d'octopamine, active la production d'AMP_c [Orr, G.L. et al., 1988]. Le 4 α -phorbol (substance inactive) n'a pas d'effet, ce qui indique la spécificité de la réaction.

L' action de l'hormone juvénile sur les glandes annexes du système reproducteur mâle de la drosophile , entraîne une synthèse de protéines qui requiert l' action du Ca⁺⁺. Les esters de phorbol initient cette synthèse de protéines . La stimulation de la synthèse des protéines n' a pas lieu si l'insecte ne possède pas de PKc (Yamamoto , K. et al.,1988) .

Chez les crustacés , on a pu montrer que l' efflux de Na⁺ peut être nettement augmenté en présence de PDBu (ester de phorbol) et de dioléine dans les muscles de *Balanus nubilus* où la présence de PKc a par ailleurs déjà été démontré . C' est principalement le flux de Na⁺ insensible à l' ouabaine qui est stimulé par l' ester de phorbol . La réponse est dépendante de la dose avec une action minimale pour une concentration en PDBu de 10⁻⁸ M . La stimulation du flux de Na⁺ est dépendante de la présence de Ca⁺⁺ dans le milieu extérieur . Si celui-ci est oté, la réponse n' apparaît plus (Bittar ,E.E. et Girard,P.R.,1986) .

En 1987, Mattson et Spazani ont démontré l'existence de la protéine kinase C dans les organes Y du crabe *Cancer antennarius* .

En présence de Ca⁺⁺, de phosphatidyl sérine et du PMA (activateur de la PKc), l' activité de la PKc est augmentée d' un facteur quatre pour une concentration en PMA de 100 nM .

Par contre, la PKc n' est pas stimulée par la calmoduline (100 nM). Le PMA augmente la stéroïdogénèse dans les organes Y et empêche l' inhibition de cette fonction par l' hormone inhibitrice de la mue (MIH), la forskoline et le dibutyryl c AMP .

L' ester de phorbol augmente également l'incorporation d' [^3H] leucine dans les protéines de l' organe Y d' une valeur de 112 % tout en n' affectant pas la synthèse d' ARN .

ORIENTATION DU MEMOIRE

CHAPITRE 2 : ORIENTATION DU MEMOIRE

Les phosphorylations de protéines catalysées par les protéines kinases contrôlées par le calcium et les phospholipides protéines kinase C sont largement répandues chez les vertébrés.

La PKc intervient par exemple dans l'activation de plusieurs systèmes de pompes ioniques tels que la $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ dans le pancréas et les hépatocytes [Lynch et al., 1986], le transport Na^+/H^+ dans les globules rouges [Siffert et Akkerman, 1988].

Cette régulation implique des phosphorylations de protéines membranaires modifiant l'environnement du ou des transporteurs [Nishizuka, 1986].

Le transport ionique comme la phosphorylation demande de l'ATP qui est continuellement régénérée pour permettre un contrôle continu des systèmes. La glycolyse va permettre la formation de deux molécules d'ATP par l'hydrolyse d'une molécule de glucose. Cette voie métabolique est contrôlée au niveau de la PFK (un des enzymes primordiaux de la voie d'Embden-Meyerhof) et l'activité de cet enzyme est elle-même dépendante notamment de son état de phosphorylation.

On peut observer que la phosphofructokinase est contrôlée par la PKc où l'activation de celle-ci provoque une modification de l'activité de la phosphofructosekinase [Hofer et al., 1985].

Le but de notre travail est de démontrer que chez les crustacés, des phosphorylations dépendantes de la PKc dans les branchies du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce et son rôle dans l'osmorégulation. Les branchies du crabe *Eriocheir sinensis* constitue un matériel d'étude très intéressant, car la branchie de cet animal présente une organisation structurale et fonctionnelle quasiment unique. Les branchies antérieures ont les caractéristiques d'un tissu respiratoire, tandis que les branchies postérieures ont les propriétés d'un tissu transporteur.

Cette dissociation permet, au niveau d'un même individu, de comparer fonctions et structures, car seules les branchies postérieures sont le siège d'un transport actif.

Pour l'étude des flux d'ions, l'utilisation de branchies, isolées et perfusées, est un matériel très pratique, permettant une étude précise des divers transporteurs et pompes [Pequeux et Gilles, 1978].

L'osmorégulation chez le crabe Chinois, acclimaté à l'eau douce, nécessite de l'énergie [Pequeux et Gilles, 1988]. La glycolyse intervient entre autre dans le

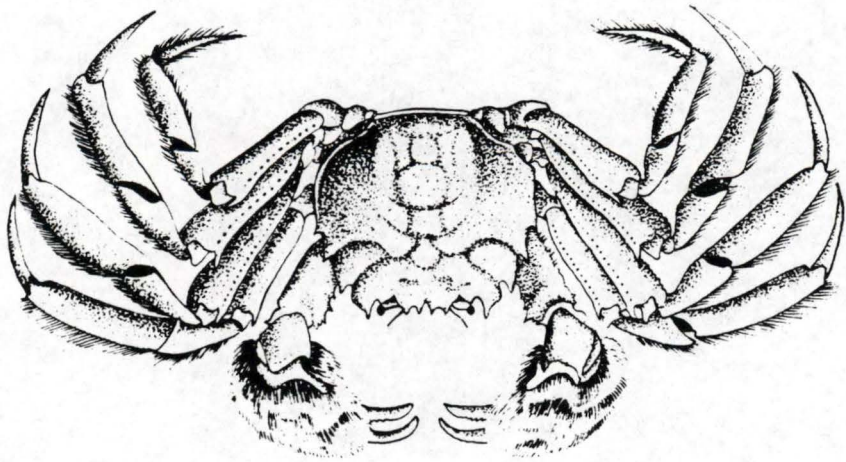
processus de régulation des réserves énergétiques et de l'ATP indispensable pour les pompes.

Nous envisagerons la possibilité que la phosphorylation de la PFK par la PKc module l'activité catalytique de cet enzyme particulièrement important dans les branchies du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

Enfin, l'incorporation de ^{32}P au niveau de structures membranaires de branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, permettra d'aborder l'hypothèse suivant laquelle des phosphorylations par la PKc peuvent être associées à l'activité transportrice d'un organe.

MATERIEL & METHODES

Eriocheir sinensis.



CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES

3.1. Matériel biologique

3.1.1. Position systématique et conditions d'élevage

- Le matériel biologique utilisé pour mettre au point la méthodologie du dosage de la PKc est le cerveau de la souris albinos de laboratoire ; ce tissu contient en effet une quantité importante de protéines kinases C.
La souris provient d'une souche NMRI obtenue par élevage non consanguin. Son poids moyen est de 35 g. Cet animal est conservé en cage et nourri de granules rats-souris entretien (UAR AO 4).
- Notre travail, à proprement parlé, utilise le crabe Chinois *Eriocheir sinensis* (H. Milne - Edwards, 1954). (Croquis ci-contre). C'est un crustacé Décapode Brachyoure Brachyrhyncha Grapsidé. Le genre *Eriocheir* compte trois espèces, une japonaise et deux chinoises. Il est très reconnaissable aux touffes de poils particulièrement abondants sur les chélipèdes du mâle. Sa croissance se fait en eau douce, mais le crabe migre vers la mer pour la reproduction.
En laboratoire, les animaux sont stockés en eau douce courante, oxygénée et maintenue à une température constante proche de 16° C (± 2 °C).
Trois fois par semaine, ils sont nourris de granules pour truites à base de farine, de sang, viande et poissons.

3.1.2. Prélèvement des organes

- La souris est anesthésiée par des vapeurs d'éther. La calotte crânienne est enlevée et le cerveau est prélevé, pesé et découpé en petits morceaux en vue de l'homogénéisation.
- Pour le crabe Chinois, nous sectionnons les ganglions nerveux avant d'ôter le bouclier céphalothoracique dorsal. Les branchies, localisées dans 2 chambres et disposées latéralement, sont découpées, débarrassées du rachis calcifié, séchées sur un paper filtre, pesées et réduites en morceaux pour l'homogénéisation.

3.1.3. Préparation des tissus

a. Principe

L'homogénéisation a pour but de libérer les structures subcellulaires en cassant les cellules. La rotation adjointe au mouvement de haut en bas du piston produit des forces de cisaillement capables d'entraîner une rupture de la membrane cellulaire.

b. Solution

Solution d'homogénéisation : pH = 7,4

Tris - HCl	(Janssen Chimica, 16.762.78 - HCl Merck, Art. 317)	20	mM
EGTA	(Janssen Chimica, 21.550.16)	10	mM
EDTA	(Janssen Chimica, 14.785.41)	2	mM
PMSF	(Sigma, P-7626)	0,1	mM
Sucrose	(Tirlemont)	250	mM

C. Mode opératoire

- Cerveau de souris.

Le broyage du cerveau de souris se réalise dans neuf volumes de solution d'homogénéisation au moyen d'un homogénéiseur de type Potter-Elvehem constitué d'un tube en pyrex (S-249) et d'un piston en teflon (A-55166). Ce dernier est monté sur une foreuse tournant à 1500 rpm (position tortue). L'homogénéisation est réalisée par plusieurs passages du piston pendant deux fois 30 secondes à 10 secondes d'intervalle et à $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

- Branchies de crabe.

L'homogénéisation des branchies est effectuée au moyen d'un homogénéiseur, de type "Kontes glass - Co - Dual (R) -size 23" constitué d'un tube et d'un piston en pyrex, dans neuf volumes de solution d'homogénéisation. La rotation de ce dernier

est de 2800 (position lièvre). L'homogénéisation se réalise comme précédemment à 4°C.

Les deux surnageants sont soumis à une centrifugation (100.000 x g) pendant 30 minutes (Beckman, Modèle L2 - 75B/Rotor R 40).

Le surnageant du cerveau de souris est alors déposé sur 500 mg de résine DE 52 (Whatman, 4057 050) (100 mg/ml) dans un tube à essai.

La résine est équilibrée avec une solution : PH = 7,4

Tris - HCl	(Janssen Chimica, 16.762.78 - HCl, Merck, Art. 317)	20mM
2-β mercaptoéthanol	(Merck, Art. 80.570)	10mM
EDTA	(Janssen Chimica, 14.785.41)	2mM
EGTA	(Janssen Chimica, 21.550.16)	10mM

La PKc est éluée par une solution de NaCl 200 mM (Merck, Art. 6404) dans le tampon d'équilibration (deux lavages).

3.2. Dosages

3.2.1. Dosages des protéines

a. Principe

La méthode utilisée dérive de celle décrite par Lowry (1951). 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 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.

b. Solution

- Mixture alcaline :

100 volumes	de	$\text{Na}_2 \text{CO}_3$	2 %	(Merck, Art. 6392)
1 volume	de	$\text{CU SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 %	(Merck, Art. 2790)
1 volume	de	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{KNA} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 %	(Merck, Art. 983)

A préparer extemporanément vu l'instabilité de la suspension cuivrique

- NaOH (Merck, Art. 6498) 1N
- Réactif de Folin-Ciocalteu (UCB, 3283)
- S A B (Albumine sérique bovine) (Merck, Art. 12018)

C. 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.

Une incubation de 30 minutes à température ambiante précède l'addition de 5 ml de la mixture alcaline. Après 15 minutes précisément, chaque tube reçoit 0,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 30 minutes de réaction, les absorbances sont lues au spectrophotomètre (PYE UNICAM SP6 - 550 UV/VIS) à 660 nm. L'étalonnage est réalisé à partir de concentrations connues et croissantes en albumine sérique bovine (SAB). La relation entre les absorbances et les concentrations en protéines est linéaire pour des quantités comprises entre 0 et 100 µg.

3.2.2. Dosage de la protéine kinase C

a. Principe

La protéine kinase C catalyse le transfert d'un γ -phosphate de l'ATP sur les résidus seryl et thréonyl de divers substrats. L'enzyme est dosé en mesurant l'incorporation de $\gamma^{32}\text{P}$ de l' $[\gamma - ^{32}\text{P}] - \text{ATP}$ sur l'histone H_1 de thymus de veau en présence de Ca^{++} , de phospholipide et de diacylglycérol. L'histone H_1 phosphorylé et radioactif est précipité par de l'acide orthophosphorique sur un papier Whatman P 81 qui après plusieurs lavages est déposé dans une fiole à scintillation placée dans un compteur à scintillation liquide (Beckman, Modèle 1801).

B. Solution

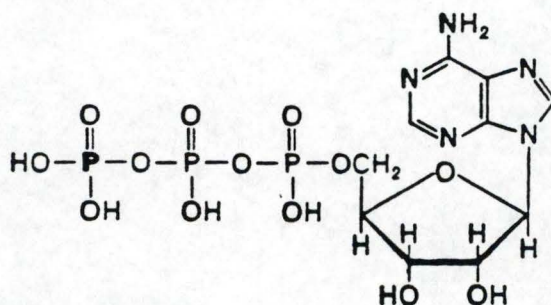
Milieu réactionnel : PH = 7,5

(concentrations finales)

Tris-HCl	(Janssen Chimica, 16.762.78 - Merck, Art. 317)	25	mM
Mg Cl ₂ . 6H ₂ O	(Merck, Art. 5833)	5	mM
EGTA	(Janssen Chimica, 21.550.16)	400	μM
Histone H ₁	(Sigma, H-5505)	200	μg/ml
Ca Cl ₂	(Merck, Art. 2382)	0,5	mM
Phosphatidyl sérine	(Sigma, P-8518)	50	μg/ml
Dioléine	(Sigma, D-3627)	0,5	μg/ml

Ces deux dernières solutions sont conservées à -20° C dans du chloroforme. Ce solvant est évaporé sous azote pour éviter toute oxydation. Le résidu formé est resuspendu dans une solution de Tris-HCl 20 mM, (PH 7,5) par sonication 5 fois 30 secondes à 0° C (Virsonic cell disrupteur, Model N° 150).

- Acide orthophosphorique (UCB, 1072) (89 %)
 - 5 ml d'acide orthophosphorique (85 %) sont dilués dans un litre d'eau.
- ATP (Sigma, A-3377) + [γ - ³²P] - ATP (NEN, NEG-002H) 20 μM
(activité spécifique : 3 - 15 10²CPM/Pmole ATP)
(Voir ci-dessous).



ATP marqué avec du ³²P sur le phosphate terminal.

c. Mode opératoire.

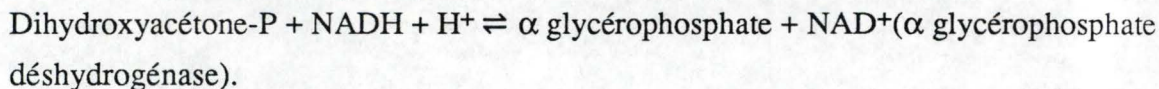
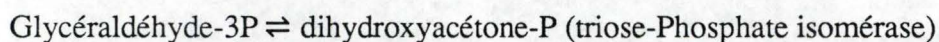
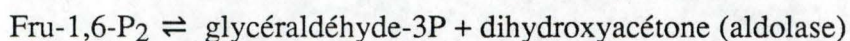
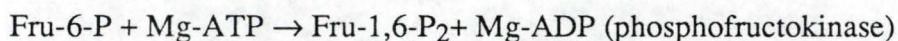
Des quantités variables de surnageant du cerveau de souris ou de branchies de crabe sont additionnées au milieu réactionnel (0,9 ml total) et la réaction est démarrée par l'addition de l'ATP radioactif. 50 μ l du milieu d'incubation sont prélevés suivant une séquence temporelle déterminée puis déposés sur du papier filtre Whatman P 81 (2,2 x 2,2 cm).

Les papiers sont alors soumis à 5 lavages dans de l'acide orthophosphorique pendant 2 minutes. Le volume des bains est choisi pour avoir au minimum 10 ml de liquide par papier filtre. Les papiers sont ensuite séchés et déposés dans des fioles de comptage contenant 4 ml de liquide scintillant Aqualuma Plus (Lumac/3MbV, 1067). Les fioles sont ensuite déposées dans un compteur à scintillation liquide (Beckman, Modèle 1801). L'activité enzymatique de la PKc est calculée en soustrayant la quantité de 32 P incorporée en présence d'EGTA 3,75 mM (activité basale) de celle incorporée en présence de Ca^{++} , PS et dioléine (activateurs de la PKc).

3.2.3. Dosage de la phosphofructokinase

a. Principe

Cette méthode s'inspire de celle de Castano (1979). 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^+ .

L'unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui transforme une μ mole de substrat en produit par minute, dans les conditions du dosage.

b. Solutions

- Milieu réactionnel : PH = 7,5
(concentrations finales)

Tampon Hepes	(Janssen Chimica, 21.500.63)	50	mM
KCl	(Merck, Art. 4936)	100	mM
MgCl ₂ . 6H ₂ O	(Merck, Art. 5833)	5	mM
NADH	(Sigma, N-8129)	0,15	mM
Hydrogénophosphate de potassium	(UCB, 1626)	5	mM
NH ₄ Cl	(Merck, Art. 1145)	1	mM

0,5 unité d'aldolase (Sigma, A-6253) et de α -glycérophosphate déshydrogénase (Boehringer, 127.787).

5 unités de triose phosphate isomérase

Mg - ATP (Merck, Art. 5833 - Sigma, A-3377) 0,5 mM
(solution aqueuse neutralisée à PH 7,0 avec du Tris)

Tous les enzymes auxiliaires ont été débarrassés du sulfate d'ammonium par filtration sur tamis moléculaire Sephadex PD - 10 (Pharmacia).

- Fructose - 6 - P (Sigma, F-3627) 5 mM

- Milieu d'incubation : PH = 7,4

HEPES	(Janssen Chimica, 16.762.78)	50	mM
EGTA	(Janssen Chimica, 21.550.16)	15	mM
Avec ou sans KF	(UCB, 1602)	100	mM

- Phosphatidyl sérine (Sigma, P-8518) 50 μ g/ml

- Dioléine (Sigma, D-3627) 5 μ g/ml

Ces deux constituants sont conservés comme décrit précédemment (3.2.2.).

- CaCl₂ (Merck, Art. 2382) 5 mM

- Mg - ATP (Merck, Art. 5833 - Sigma, A-6253) 0,12 mM

Toutes ces concentrations représentent des concentrations finales.

C. Mode opératoire

Les branchies postérieures sont homogénéisées (Voir Matériel et Méthodes) dans 5 volumes de solution d'homogénéisation avec ou sans KF (100 mM) : le fluorure est utilisé comme inhibiteur de phosphatases.

L'homogénat est centrifugé (15.000 x g) pendant 30 minutes à 4°C (Beckman, Modèle L2 - 75 B). La mesure de l'activité enzymatique de la PFK est précédée par une incubation de 30 minutes de surnageant à température ambiante. 50 µl de surnageant sont alors mis en contact avec le milieu réactionnel et diverses concentrations en Fructose - 6 - P (de 0,02 mM à 3 mM) dans un volume final de 1 ml. On amorce la réaction par l'addition de Fructose - 6 - P. Les mesures d'absorbance à 340 nM sont effectuées au moyen d'un spectrophotomètre (Ultraspec LKB) durant 3 minutes. A chaque valeur du test est soustraite la valeur de l'absorbance du blanc obtenue en l'absence de Fructose - 6 - P). Les cinétiques obtenues ont été analysées par la transformation de Hill.

Dans le cadre de l'étude qui envisage l'effet de la phosphorylation de la PFK sur son activité, nous modifions le mode opératoire de la manière suivante : nous préincubons durant 30 minutes à température ambiante en absence de KF (inhibiteur des phosphatases) pour déphosphoryler la PFK. Ce milieu est ensuite incubé 30 minutes, à température ambiante, en présence de Mg-ATP (120 µM) et des activateurs de la PKc : dioléine, CaCl₂ et phosphatidyl sérine. Le dosage enzymatique est identique à celui décrit précédemment.

3.3. Etude des mouvements ioniques

3.3.1. Perfusion des branchies

a. Principe

On appelle perfusion d'une branchie, la circulation d'une solution isotonique à l'hémolymphe dans les branchies postérieures isolées du crabe *Eriocheir sinensis*. Cette solution de perfusion est appelée solution "in". Les branchies sont baignées dans une solution de même composition ionique (solution "out").

b. Solution

- Solution saline : Ringer "eau douce"

NaCl	(Merck, Art. 6404)	240	mM
KCl	(Merck, Art. 4936)	5	mM
Mg Cl ₂ . 6 H ₂ O	(Merck, Art. 5833)	5	mM
CaCl ₂	(Merck, Art. 2382)	12,5	mM
H ₃ BO ₃	(Merck, Art. 165)	8,8	mM

Le PH est ajusté à 7,6 avec du Tris.

C. Mode opératoire

Après avoir ôté la carapace, chaque branchie est rincée abondamment dans la solution isotonique et l'hémolymphe résiduelle est expulsée par cette même solution au moyen d'une seringue. Seules les branchies postérieures (branchies 7 et 8) sont employées pour la perfusion. Un cathéter est placé dans le vaisseau afférent et en outre dans le vaisseau efférent des branchies. Ceux-ci sont fixés par une petite pince en plexiglas. La branchie est alors immergée dans 15 ml de solution saline dénommée solution d'incubation ou "out". Le cathéter fixé dans le canal afférent est branché à une ampoule contenant la solution saline appelée solution "in". L'ampoule est située 15 cm au-dessus du berlin où baigne la branchie. La pression hydrostatique qui en résulte maintient une vitesse de perfusion de $\pm 0,3$ ml/minute. La solution circulant dans la branchie est recueillie dans un récipient par l'intermédiaire du cathéter placé dans le canal efférent. Le milieu d'incubation est oxygéné, ce qui accroît la viabilité des branchies.

3.3.2. Mesure de la différence du potentiel

La différence de potentiel électrique qui apparaît entre le milieu "out" et le milieu "in" est liée à l'activité des pompes ioniques qui modifient les flux d'ions. Cette différence peut être mesurée au moyen de deux électrodes au calomel reliées par un pont d'agar. L'électrode de référence est plongée dans la solution extérieure tandis que l'autre électrode est placée dans le récipient et où est recueillie la solution de perfusion. Les deux électrodes sont connectées à un électromètre (Metrohm E 630).

3.3.3. Mesures des flux d'ions

a. Principe

Le but de ces expériences est d'observer le flux d'un ion au travers d'un compartiment cellulaire. Un isotope radioactif de l'ion considéré est placé, soit dans le milieu "in", soit dans le milieu "out" et, connaissant son activité spécifique (CPM/ μ mole), la quantité d'ions transportés de la face interne vers la face externe ou l'inverse peut être calculée.

b. Solution

- $^{22}\text{NaCl}$ (Amersham SKS-1) dans le Ringer "eau douce" : 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$.
- Na^{36}Cl (Amersham CIS-3) dans le Ringer "eau douce" : 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$.

C. Mode opératoire

L'expérience du flux entrant d'ions est réalisé de la manière suivante : lorsque la DDP est stable, le Ringer "eau douce" de la solution baignant la branchie est remplacé par cette même solution dans laquelle on ajoute des ions radioactifs. Puisque nous étudions le transport des ions de la face externe vers la face interne, c'est-à-dire du milieu extérieur vers le milieu "in", nous prélevons la solution du milieu interne récoltée dans un récipient, par l'intermédiaire des cathéters, pour la déposer dans une fiole qui sera placée dans un compteur à scintillation pour permettre un dosage de l'ion radioactif concerné.

Le flux sortant concerne le transport des ions de la face interne vers la face externe, c'est-à-dire du milieu de perfusion vers le milieu baignant la branchie. Nous remplaçons à ce moment l'ampoule contenant le Ringer "eau douce" par un Ringer "eau douce" contenant l'isotope radioactif. Nous prélevons alors, toutes les 5 minutes, 1 ml de solution Ringer "eau douce" du milieu extérieur et nous remplaçons 1 ml de Ringer "eau douce" dans ce même milieu. Il est en effet particulièrement important de conserver toujours le même volume total "out" tout au long de l'expérience.

Note :

Le $^{22}\text{Na}^+$ ne nécessite pas de liquide scintillant, tandis qu'au $^{36}\text{Cl}^-$, on ajoute un scintillant (Pico fluor - 30 Packard) (8 volumes Pico fluor/1 volume de solution).

3.4. Phosphorylation des protéines endogènes

3.4.1. Incubation en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

a. Principe

Les protéines d'un surnageant (3000 x g) de branchies postérieures sont incubées en présence de ^{32}ATP pendant 15 minutes. Après arrêt de la réaction, on mesure l'incorporation de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ au niveau des protéines d'un culot (100.000 x g) soit quantitativement (nombre total de CPM), soit qualitativement par autoradiographie d'un gel de polyacrylamide.

b. Solution

- Solution d'incubation : PH = 7,5

(concentrations finales)

Tris-HCl	(Janssen Chimica, 16.762.78 - Merck, Art. 317)	25	mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	(Merck, Art. 5833)	5	mM
EGTA	(Janssen Chimica, 21.550.16)	0,4	mM
CaCl ₂	(Merck, Art. 2382)	0,5	mM
Phosphatidyl sérine	(Sigma, P-8518)	50	μg/ml
Dioléine	(Sigma, D-3627)	0,5	μg/ml
- ATP (Sigma, A-3377) + $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (NEN, NEG-002H)		50	μM
(activité spécifique = 100 CPM/P mole ATP)			
- Acide orthophosphorique 85 % (UCB, 1072) : dilué 200 x V/V			

C. Mode opératoire

Les branchies sont homogénéisées comme décrit dans 2.1.2. L'homogénat est centrifugé (3000 x g) (Beckman, Modèle L2-75 B/ Rotor R 40) pendant 15 minutes à 4° C. 800 μl du surnageant de cette centrifugation sont incubés en présence du milieu réactionnel et d' $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ pendant 15 minutes dans un volume de 2ml. La réaction est arrêtée en ajoutant un excès d'ATP dans le milieu (11 mM final).

Cette solution est centrifugée (100.000 x g) pendant 30 minutes (Beckman, Modèle L2-75B/Rotor R 40). Le culot est resuspendu dans un minimum de tampon Tris-HCl 20 mM PH 7,9. Les protéines de l'échantillon sont précipitées avec 4 volumes d'acétone froid (Belgolabo, 490013) pendant 10 minutes. La préparation acétonique est centrifugée à 9500 x g (Sorval RC-5) pendant 5 minutes. Les protéines précipitées sont resuspendues dans un volume variable de tampon (Tris-HCl 0,5 M PH 6,8) afin d'obtenir la même quantité de protéines par unité de volume. Deux fois 50 µl de cette solution sont déposés sur un papier filtre Whatman P 81 qui est lavé 5 fois à l'acide orthophosphorique (2 minutes chaque lavage). Les papiers sont alors séchés et déposés dans une fiole à scintillation contenant 4 ml d'Aqualuma Plus (Lumac/3 MbV, 1067). Les fioles sont déposées dans un compteur à scintillation liquide (Beckman, Modèle 1801). Le reste de la préparation acétonique resuspendue est employé pour l'électrophorèse.

3.4.2. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

a. Principe

Le but de cette étape est de dérouler les protéines afin de les analyser sur gel d'électrophorèse où elles migreront selon leur poids moléculaire.

b. Solution

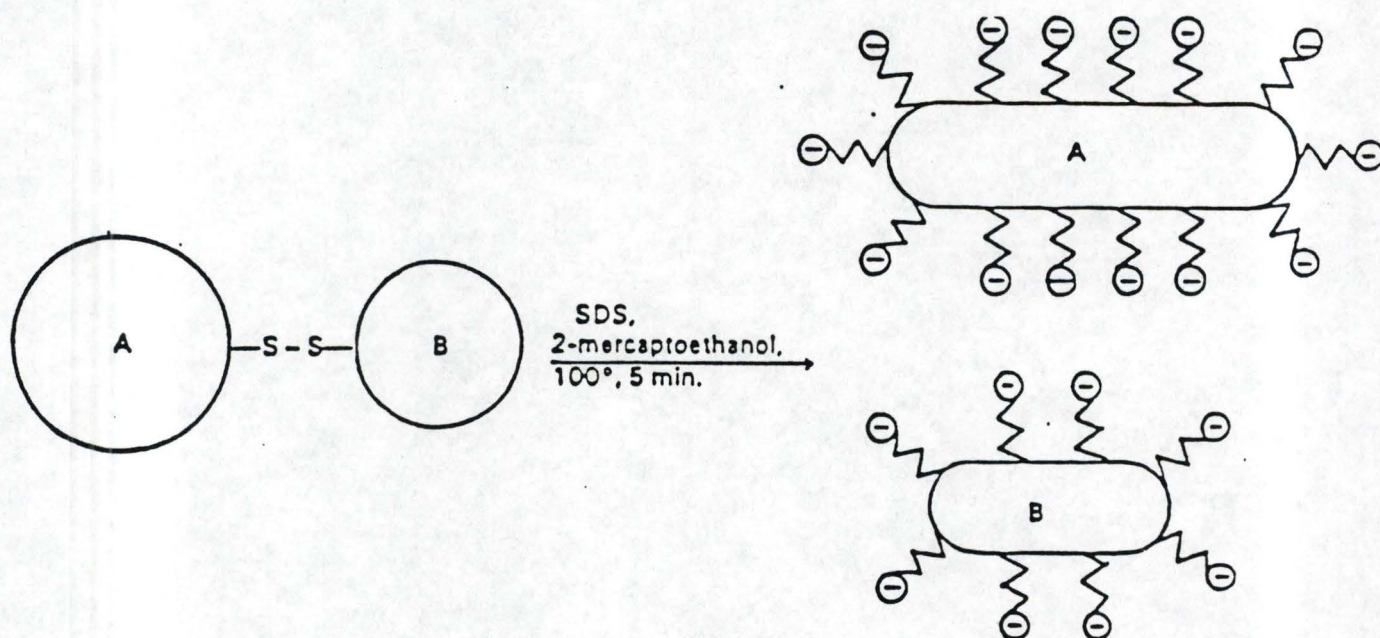
- Solubiliseur : PH = 6,8

SDS	(Merck, Art. 13.760)	10	%
Tris-HCl	(Janssen Chimica, 16.762.78 - Merck, Art. 317)	25	mM
2 β-mercaptoéthanol	(Merck, Art. 805740)	10	%
Glycérol	(UCB, 1384)	50	%
Bleu de Bromophénol	(Merck, Art. 8122)	0,25	%

C. Mode opératoire

Les protéines sont mises en présence du solubiliseur (4 volumes d'échantillon pour un volume de solubiliseur). Ce mélange est porté à 100° C pendant 5 minutes. Cette étape provoque un déroulement des protéines par action de la chaleur et le SDS apporte des charges négatives à la molécule.

En outre, par ce procédé, on décompose les protéines 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) (Voir figures ci-dessous).



Le mélange contient du glycérol pour alourdir l'échantillon et du bleu de Bromophénol pour suivre le front de migration.

3.4.3. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium de dodécylsulfate (SDS)

a. 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.

b. Solution

* Gel de polyacrylamide- Running gel : PH = 8,8

Tris-HCl	(Janssen Chimica, 16.762.78 - Merck, Art. 317)	0,375 M
Acrylamide	(Bio-Rad, 161-0100)	10 %
Bisacrylamide	(Bio-Rad, 161-0200)	0,27 %
SDS	(Merck, Art. 13.760)	0,1 %
Temed	(Bio-Rad, 161-800)	0,05 %
Persulfate d'ammonium	(Bio-Rad, 161-070)	0,05 %

- Stacking gel : PH = 6,8

Tris-HCl		0,125 M
Acrylamide		3 %
Bisacrylamide		0,08 %
SDS		0,1 %
Temed		0,05 %
Persulfate d'ammonium		0,05 %

* Tampon d'électrophorèse : PH = 8,3

Tris	(Janssen Chimica, 16.762.78)	25 mM
Glycine	(UCB, 1011)	192 mM
SDS	(Merck, Art. 13.760)	0,1 %

* Etalons Amesham Rainbow marqués au ¹⁴C (CFA 756)

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

Remarques

1. 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.

2. 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 par gramme de protéines de sorte que chaque molécule à la même densité de charges négatives quelle que soit sa charge de départ. Les protéines ainsi traitées migrent dans le gel de polyacrylamide uniquement en fonction de leur taille.

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

C. Mode opératoire (d'après Laemmli, 1970).

Les gels sont coulés entre 2 plaques de verre séparées par des espaceurs de 0,7 mm suivant le système Bio-Rad. Le running gel (10 % d'acrylamide) est surmonté pendant la polymérisation d'alcool isolamylique (Merck, Art. 979) pour éviter le contact avec l'O₂. La polymérisation dure \pm 10 minutes. Le stacking gel (3 %) est ensuite coulé et le peigne moulant les 12 puits est inséré dans celui-ci. Les échantillons sont déposés à raison de 50 μ l à 100 μ l par puits. Parallèlement, on fait migrer des protéines de PM connu (étalon Amersham Rainbow ¹⁴C, CFA 756).

La migration a lieu dans une cuve à électrophorèse (Protean II Bio-Rad) refroidie à l'eau courante et remplie de tampon d'électrophorèse. Un courant continu de 40 à 50 mAmpères par plaque est appliqué pendant \pm 4 heures (générateur Pharmacia EPS 500/400).

3.4.4. Autoradiographie

a. Principe

L'autoradiographie permet de mettre en évidence, par l'impression d'une plaque photographique, l'incorporation d'isotopes radioactifs par des protéines ayant migrées dans un gel.

b. Solution

- TCA (acide trichloracétique)	(Janssen Chimica, 15.213.81)	12 %
- Méthanol	(Merck, Art. 6009)	50 %
- Enlighting	(NEN, NEF-974)	
- Révélateur	(Kodak, LX 24)	
- Fixateur	(Kodak, AL 4)	

c. Mode opératoire

Après électrophorèse, le gel est placé dans une solution de TCA (12 %) pendant 15 minutes. Le gel est ensuite immergé pendant 30 minutes dans le Enlighting, qui contient un fixateur et un liquide scintillant permettant la conversion du rayonnement β en photons. Enfin, on déshydrate le gel dans un bain de méthanol 50 % pendant 30 minutes, ce qui accélère le séchage. Après séchage sous vide à 60° C dans un appareil Pharmacia (GSD-4), le gel est mis en contact avec un film radiographique Kodak XAR-5 dans une cassette Kodak X-omatic Regular. L'exposition se fait à - 80° C et sa durée dépend de la quantité de matériel radioactif déposé sur le gel. La "révélation" du film se réalise à température ambiante de la manière suivante : la plaque photographique est placée successivement dans le révélateur (5 minutes), dans un bain d'arrêt (H₂O) (1 minute) et dans le fixateur (15 minutes). La plaque est alors abondamment rincée à l'eau et séchée.

RESULTATS

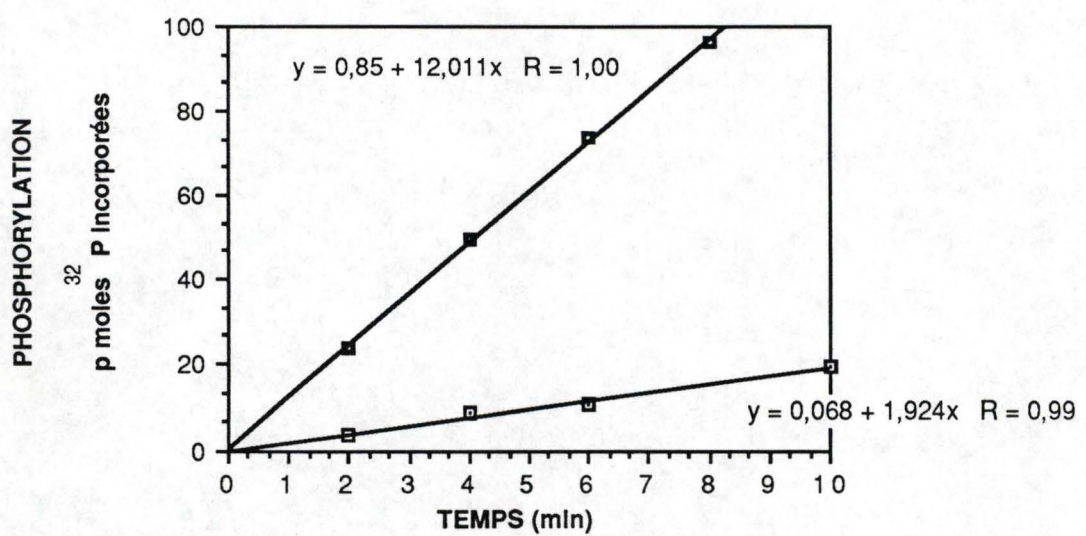


Fig. 1 : Variation, en fonction du temps, de l'incorporation de $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ au niveau de l'histone H_1 pour $50 \mu\text{l}$ de surnageant du cerveau de souris, en présence (■) et en l'absence (□) de Ca^{++} ($0,5 \text{ mM}$), de dioléine ($0,5 \mu\text{g/ml}$) et de phosphatidyl sérine ($50 \mu\text{g/ml}$).

CHAPITRE 4 : RESULTATS

4.1. Dosage de la protéine kinase C

4.1.1. Mise en évidence de la protéine kinase C dans le cerveau de souris

a. Matériel biologique

Comme le cerveau de souris représente l'organe où l'on retrouve le taux le plus élevé de protéine kinase C (PKc), la mise au point de notre méthodologie est réalisée grâce à cet organe.

Un homogénat de cerveau de souris (Voir Matériel et Méthodes) est centrifugé (100.000 x g) pendant 30 minutes. Le surnageant de cette centrifugation est déposé sur une résine DE 52 (Whatman). Nous avons pu montrer que l'activité enzymatique qui nous intéresse est éluee par une solution de NaCl 200 mM.

b. Résultats

La mise en évidence de l'activité enzymatique de la PKc, déterminée en mesurant la phosphorylation d'un substrat, ne peut se réaliser qu'en présence de divers activateurs : l'ion calcium, la phosphatidyl sérine et la dioléine (diglycéride).

Nous déterminons l'activité enzymatique de la protéine kinase C en mesurant l'incorporation de [γ - ^{32}P] provenant de l'ATP, sur l'histone H₁ qui constitue le substrat spécifique de cette protéine kinase ; la spécificité de l'activité enzymatique est en plus liée à la présence de Ca⁺⁺, phosphatidyl et dioléine. En présence de ces activateurs, nous parlerons de phosphorylation totale et nous appellerons phosphorylation basale, celle obtenue en l'absence des activateurs.

Ces études préliminaires utilisant un cerveau de souris visent à contrôler deux paramètres importants de l'activité cinétique de la protéine kinase C : la linéarité dans le temps et en fonction de la concentration en substrat

La figure 1 représente la vitesse d'incorporation du ^{32}P sur l'histone H₁ pour 50 μl de surnageant. Nous observons que cette vitesse est linéairement proportionnelle au temps d'incubation et cela pendant 8 minutes. Pour trois concentrations croissantes, la vitesse d'incorporation exprimée en P moles/minutes est directement proportionnelle à la quantité de surnageant (Voir tableau I).

	50 μ l	100 μ l	130 μ l
Phosphorylation totale (P moles 32 P incorporées/minute)	12,0	28,9	34,6
Phosphorylation basale (P moles 32 P incorporées/minute)	1,9	4,8	5,1
Activité enzymatique de la PKc (P moles 32 P incorporées/minute)	10,1	24,1	29,5

Si nous exprimons l'activité enzymatique de la PKc (phosphorylation totale - phosphorylation basale) par mg de protéine, nous obtenons une valeur moyenne (pour les trois concentrations enzymatiques) égale à 115,1 P moles 32 P incorporées/min/mg protéine.

C. Conclusions

L'étude cinétique préliminaire effectuée sur un cerveau de souris nous a permis de mettre au point une méthodologie qui montre la linéarité de la variation de l'activité de la PKc en fonction du temps et de la concentration d'enzyme.

4.1.2. Mise en évidence de la PKc dans les branchies du crabe *Eriocheir sinensis*

a. Matériel biologique

Notre objectif est de déceler une activité enzymatique liée à la protéine kinase C dans les branchies antérieures ou postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce.

Après une homogénéisation (Voir 3.1.2.), un extrait de branchies antérieures et postérieures est soumis à une centrifugation (100.000 x g) pendant 30 minutes. Le dosage se réalise sur le surnageant.

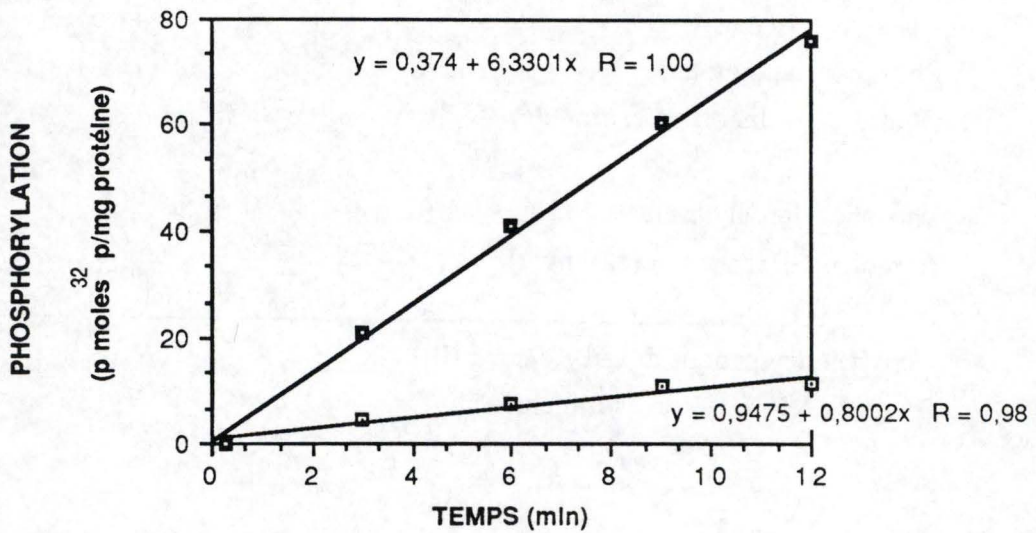


Fig. 2 : Evolution, en fonction du temps, de l'incorporation de $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ au niveau de l'histone H₁ sur une fraction cytosoluble de branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, en présence (■) et en l'absence (□) de Ca²⁺ (0,5 mM), de dioléine (0,5 μg/ml) et de phosphatidyl sérine (50 μg/ml).

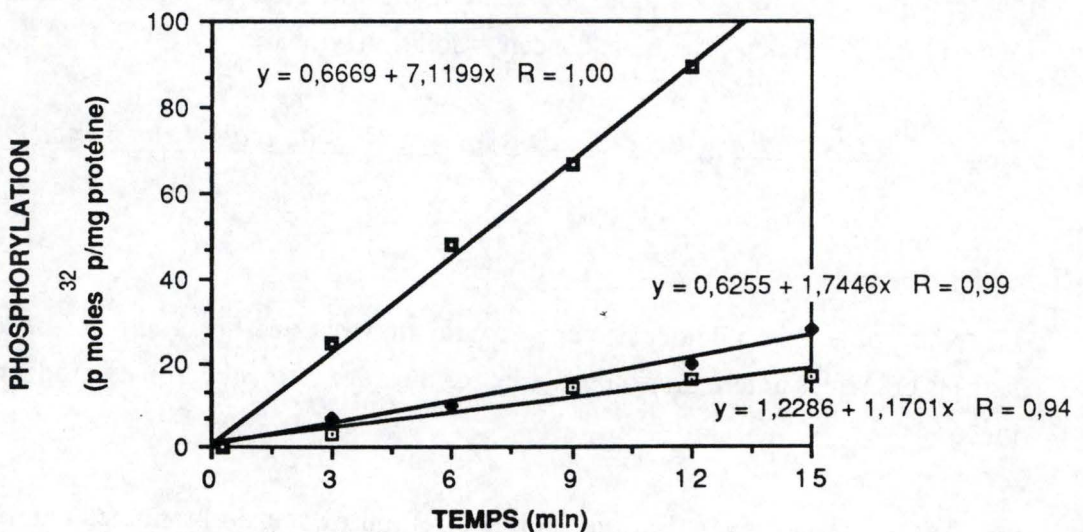


Fig. 3 : Evolution, en fonction du temps, de l'incorporation de $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ au niveau de l'histone H₁ sur une fraction cytosoluble de branchies antérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, en présence (■) et en l'absence (□) de Ca²⁺ (0,5 mM), de dioléine (0,5 μg/ml) et de phosphatidyl sérine (50 μg/ml). (●) Phosphorylation avec le Ca²⁺ et la dioléine sans la phosphatidyl sérine.

b. Résultats

Les figures 2 et 3 montrent l'incorporation de ^{32}P sur l'histone H_1 en fonction du temps dans les branchies postérieures et antérieures : la linéarité est maintenue pendant 15 minutes. Rappelons que l'activité de la protéine kinase C est égale à la phosphorylation totale moins la phosphorylation basale.

	Branchies antérieures	Branchies postérieures
Phosphorylation totale (avec $\text{Ca}^{++}/\text{D}/\text{PS}$) (P moles ^{32}P incorporées/min/mg prot.)	7,02	6,33
Phosphorylation basale (sans $\text{Ca}^{++}/\text{D}/\text{PS}$) (P moles ^{32}P incorporées/min/mg prot.)	1,17	0,8
Activité enzymatique de la protéine kinase C (P moles ^{32}P incorporées/min/mg prot.)	5,85	5,53

PS = phosphatidyl sérine

D = dioléine

Aucune différence importante de l'activité de la protéine kinase C n'apparaît entre les branchies postérieures et antérieures (voir tableau ci-dessus).

Si la réaction est effectuée sans phosphatidyl sérine (substance nécessaire pour activer la PKc), la vitesse d'incorporation du ^{32}P est très proche de celle obtenue pour la phosphorylation basale.

Notons également que ces mêmes solutions enzymatiques conservées 24 heures à 4°C perdent leur activité liée à la PKc tout en conservant la même activité basale (Fig. 4).

Ce même phénomène apparaît après congélation à -20°C . L'instabilité de la PKc (soit après 24 heures à 4°C ou une congélation à -20°C) implique clairement le caractère extemporané du dosage.

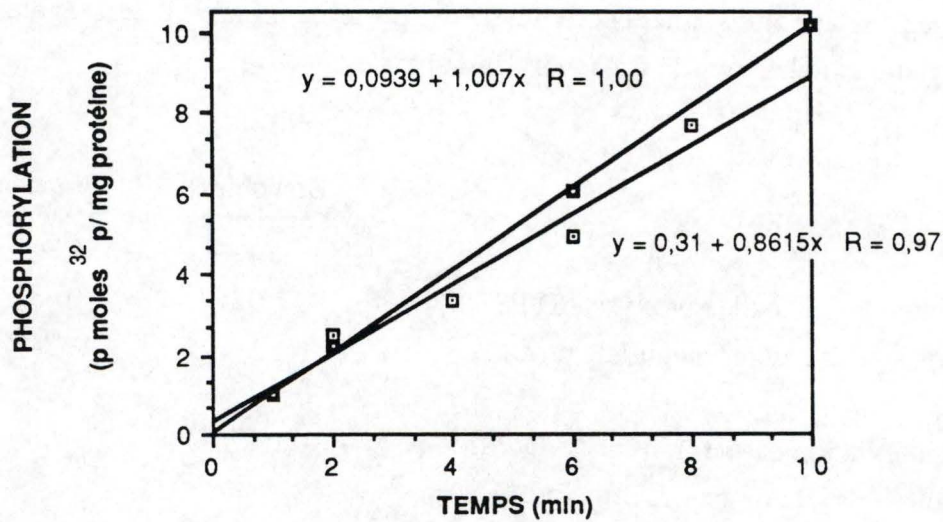


Fig. 4 : Effet de la conservation à 4° C pendant 24 heures, sur l'incorporation de [γ - ³²P] au niveau de l'histone H₁ pour un surnageant de branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, en présence (■) et en l'absence (□) de Ca⁺⁺ (0,5 mM), de dioléine (0,5 μ g/ml) et de phosphatidyl sérine (50 μ g/ml).

Conclusion

La phosphorylation, en présence de Ca^{++} , de dioléine et de phosphatidyl sérine est nettement accrue par rapport à celle obtenue sans ces divers activateurs (phosphorylation basale).

Il semble bien que cette augmentation est due à la protéine kinase C, car lorsque nous ôtons la PS du milieu d'incubation, nous ne percevons pas d'augmentation de la phosphorylation malgré la présence de Ca^{++} et de dioléine. Les protéines kinases dépendantes seulement du Ca^{++} devraient donc être activées pendant que la protéine kinase C ne l'est pas.

4.2. Rôle de la protéine kinase C dans l'osmorégulation

4.2.1. Introduction

On sait que la protéine kinase C agit au niveau des pompes ioniques, dans les hépatocytes, les acini du pancréas et dans les globules rouges (Voir Introduction bibliographique). Cette action concerne principalement le transport de sodium et de potassium. Les expériences présentées dans ce chapitre ont pour objectif de voir si la protéine kinase C peut influencer le transport ionique. Puisque, seules les branchies postérieures sont le siège d'un transport actif, nous utiliserons ce matériel pour observer l'action de la kinase sur le mouvement ionique et l'osmorégulation.

Le problème a été abordé sous deux aspects :

- D'une part, nous étudierons l'effet de diverses substances (activateurs et inhibiteurs de la PKC) sur la différence de potentiel qui apparaît entre la face apicale et la face sérosale, c'est-à-dire entre le milieu baignant la branchie ou "out" et le milieu de perfusion ou "in".
Cette différence de potentiel dépend essentiellement de l'activité des pompes ioniques actives au niveau des membranes sérosale et apicale.
- D'autre part, nous envisagerons, d'une manière plus spécifique, l'effet d'activateurs de la protéine kinase C sur le flux de $^{22}\text{Na}^+$ ou de $^{36}\text{Cl}^-$ au travers des branchies postérieures.

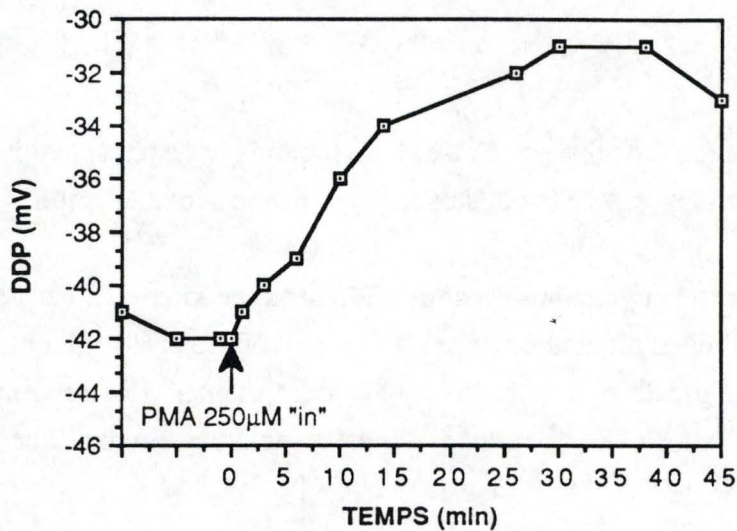


Fig. 5 : Variation , en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure (isolée et perfusée) du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de PMA (250 μ M) dans le milieu de perfusion ("in").

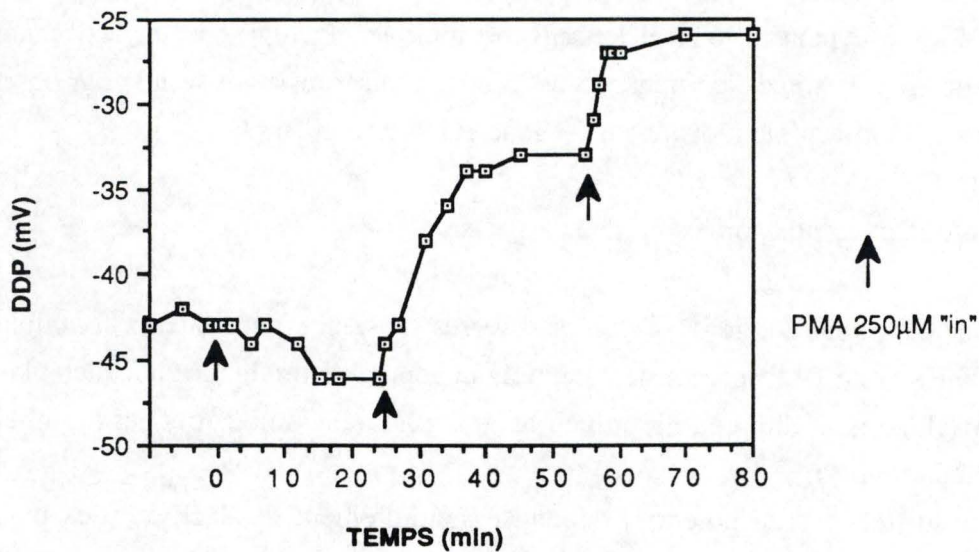


Fig. 6 : Variation , en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure (isolée et perfusée) du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition successive de PMA (250 μ M) dans le milieu de perfusion ("in").

4.2.2. Action de diverses substances sur la différence de potentiel (DDP) au niveau des branchies postérieures

4.2.2.1. Effet d'activateurs de la PKc

a. Matériel biologique

Nous prélevons des branchies postérieures isolées que nous perfusions avec une solution de même propriété osmotique que l'hémolymphe. Le liquide de perfusion pénètre dans la branchie par un cathéter placé dans le canal afférent, cette solution se répand dans la branchie et ressort par le canal efférent où est fixé un cathéter qui recueille le liquide de perfusion dans un récipient.

La solution qui perfuse la branchie est appelée liquide de perfusion "in" puisqu'il passe dans la branchie. La branchie baigne dans une solution identique à la solution de perfusion. Celle-ci est dénommée liquide de perfusion "out", car il se situe à l'extérieur de la branchie.

Pour mettre en évidence un effet de la PKc sur l'activité transportrice de la branchie, nous exploitons une des propriétés de cet enzyme : son activation par les esters de phorbol en présence d'ions Ca^{++} .

Le phorbol ester employé dans le cadre de nos expériences est le PMA (phorbol 12 - myristate - 13 - acétate).

Les esters de phorbol ont une structure se rapprochant quelque peu du diacylglycérol (autre activateur de la PKc) et vont exercer le même effet que celui-ci, c'est-à-dire qu'ils mobilisent la PKc cytosoluble et inactive vers la membrane où elle deviendra active.

Le PMA, substance liposoluble, s'inclut dans les membranes et active la PKc, qui à cet instant, pourrait agir sur les pompes ioniques.

b. Résultats

Lorsque le PMA 250 μM est additionné au milieu "in" (milieu de perfusion), la différence de potentiel électrique (DDP) passe de -42 mVolt à - 31 mVolt (Voir Fig. 5). Cette dépolarisation dure environ 30 minutes puis la DDP tend à revenir à sa valeur initiale.

Si nous effectuons une perfusion avec des doses successives de PMA (250 μM), des dépolarisations successives sont observées (Fig. 6).

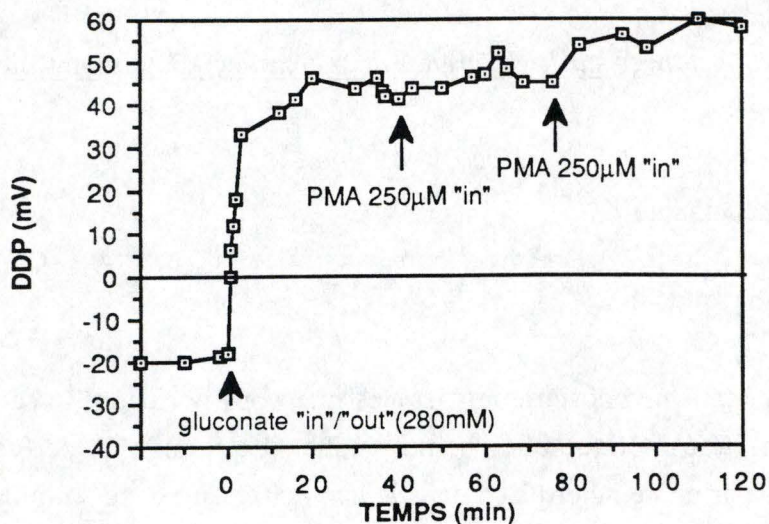


Fig. 7 : Effet de l'addition successive de PMA (250 µM) dans le milieu de perfusion ("in") sur la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure (isolée et perfusée) du crabe *Eriocheir sinensis*, après substitution du Cl⁻ par du gluconate dans le milieu "in" et "out".

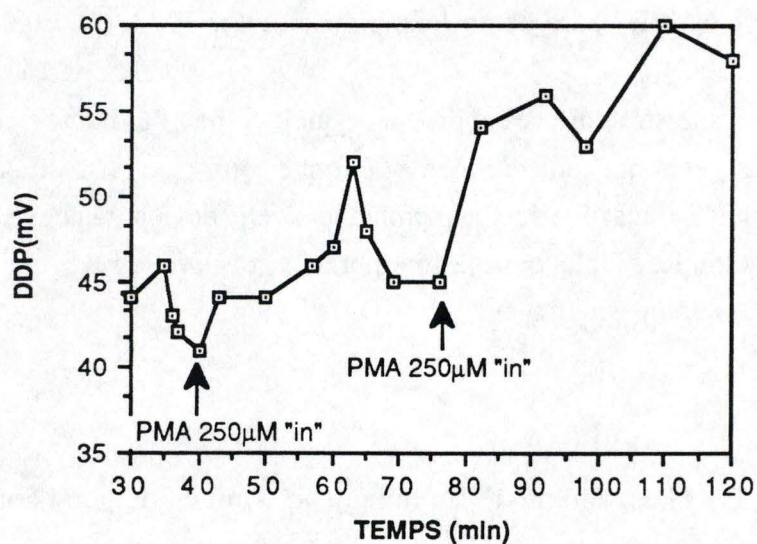


Fig. 8 : Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure du crabe *Eriocheir sinensis*, lors de l'addition successive de PMA (250 µM) dans les conditions décrites dans la Fig. 7.

Ces résultats peuvent être expliqués si l'on considère une activation du flux des ions $+$ de la face apicale ou externe vers la face sérosale ou interne. L'augmentation du flux des ions $+$ va accroître le nombre d'ions $+$ présents dans le milieu "in". Comme celui-ci est négatif, ce transport d'ions $+$ neutralise les charges négatives du milieu interne et diminue donc la différence de potentiel électrique qui peut apparaître entre les deux faces de la branchie. Ceci se traduit par une dépolarisation.

La disparition de ce phénomène après 30 minutes est vraisemblablement liée à la destruction ou à l'inactivation du PMA. Cette substance est sensible à la lumière.

Les dépolarisations successives avec de nouvelles doses de PMA renforcent cette explication.

Le PMA pourrait perméabiliser les membranes provoquant une diffusion libre des ions et une dépolarisation de la DDP.

Pour conforter cette hypothèse, nous réalisons une perfusion où nous remplaçons, les ions Cl^- des milieux extérieur et intérieur par du gluconate, anion non diffusible (Pequeux et Gilles, 1988).

Lorsque nous substituons le gluconate au Cl^- , nous observons une brusque variation de la DDP qui passe de - 20 mVolt à + 50 mVolt (Fig. 7). L'addition successive de PMA (250 μM) dans le milieu "in" provoque une hyperpolarisation (Fig. 8). Ce phénomène peut s'expliquer en considérant, comme précédemment, une activation du flux des ions $+$. Du fait de la substitution du Cl^- par du gluconate, le milieu "in" devient positif. Lors de l'activation des pompes ioniques par le PMA, un apport d'ions $+$ apparaît dans le milieu "in", ce qui occasionne une hyperpolarisation.

4.2.2.2. Effets d'inhibiteurs de la PKc

La chlorpromazine et la trifluopérazine peuvent être utilisées comme inhibiteurs des effets liés à la protéine kinase C. Ces deux inhibiteurs semblent agir d'une manière spécifique sur les interactions hydrophobes entre la protéine kinase C et les phospholipides. Ils entreraient en compétition avec la phosphatidyl sérine en se plaçant dans les membranes (Mori, T et al., 1980).

Ces deux produits additionnés dans le milieu "in" provoquent une brusque dépolarisation (Fig. 9 et 10).

Cet effet est irréversible ; lorsque nous ôtons ces inhibiteurs et les remplaçons par une solution de Ringer "eau douce", la DDP ne revient pas à son niveau d'origine.

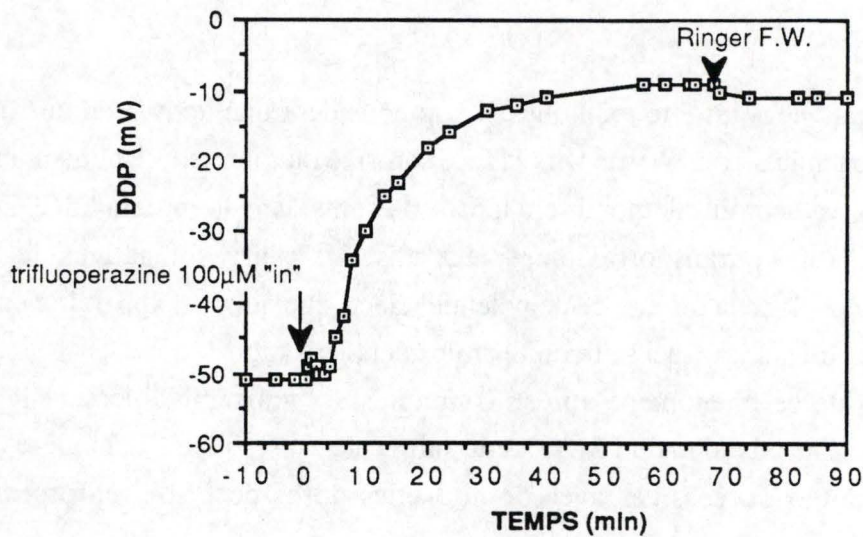


Fig. 9 : Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure (isolée et perfusée) du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de Trifluopérazine (100 μM) dans le milieu de perfusion ("in").

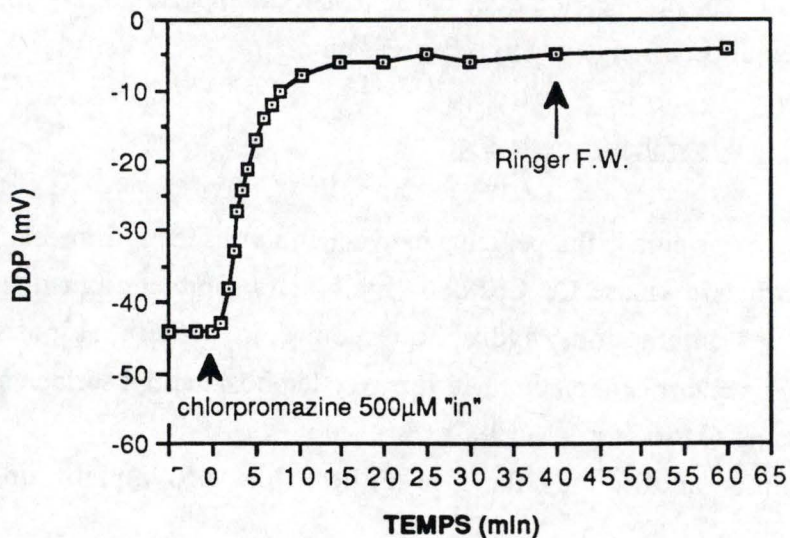


Fig. 10 : Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure (isolée et perfusée) du crabe Chinois *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de Chlorpromazine (500 μM) dans le milieu de perfusion ("in").

L'irréversibilité du phénomène suggère que ces deux substances ont un effet non spécifique sur le transport des ions. Elles perméabiliseraient la membrane, entraînant une diffusion libre des ions se marquant par une brusque dépolarisation irréversible.

c. Conclusion

Le PMA (activateur de la PKc) agit sur le transport des ions + lorsqu'il est additionné au milieu "in", agissant sur la face sérosale.

Cet effet n'a pu être observé pour une addition de PMA dans le milieu "out".

L'effet de divers inhibiteurs ne semble pas, dans nos conditions expérimentales, lié à la PKc, car ils provoquent une modification irréversible de la perméabilité membranaire.

4.2.3. Action de la PKc sur les flux de Na^+ et Cl^-

La deuxième série d'expériences a pour but de découvrir les ions dont le transport est affecté par les activateurs de la PKc. Nous perfusions des branchies avec des isotopes radioactifs $^{22}\text{Na}^+$ et $^{36}\text{Cl}^-$ et observons la variation du flux entrant et ou sortant de ces isotopes radioactifs. Pequeux et Gilles ont bien montré en 1981, qu'il existe un flux entrant de $^{22}\text{Na}^+$ d'environ 300 $\mu\text{eq/g/heure}$ s dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

Les expériences de flux "entrant" sont réalisées de la manière suivante : nous plaçons, dans la solution "out" Ringer "eau douce" ou solution baignant les branchies, du $^{22}\text{Na}^+$ (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$) ou du $^{36}\text{Cl}^-$ (0,25 $\mu\text{Ci/ml}$).

Nous laissons perfuser quelques minutes afin de permettre une normalisation du flux, puis nous prélevons, toutes les 5 minutes, le liquide de perfusion "in" provenant de la branchie, canalisé par les cathéters et recueilli dans un récipient.

Puisqu'il existe un transport de Na^+ et Cl^- de l'extérieur vers l'intérieur de la branchie, la solution de perfusion "in" provenant du milieu intérieur s'enrichit en isotopes radioactifs.

Après 30 minutes de perfusion en présence des isotopes radioactifs, nous ajoutons les activateurs de la PKc, soit dans la solution perfusant la branchie, c'est-à-dire milieu "in", soit dans la solution extérieure baignant la branchie, c'est-à-dire milieu "out".

a. Action des activateurs de la PKc sur le flux entrant de $^{22}\text{Na}^+$

Les deux activateurs employés pour ce type d'expérience sont le PMA (phorbol 12 - myristate - 13 - acétate) et l'OAG (1 - oleyl - 2 - acétyl - glycérol).

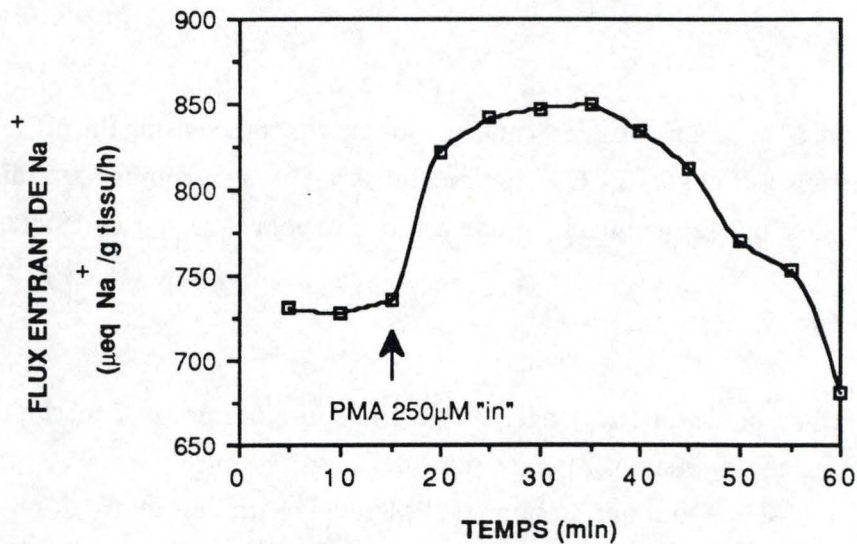


Fig. 11 : Variation, en fonction du temps, du flux "entrant" de $^{22}\text{Na}^+$ dans une branchie postérieure (isolée et perfusée) du crabe Chinois *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de PMA ($250\ \mu\text{M}$) dans le milieu de perfusion ("in").

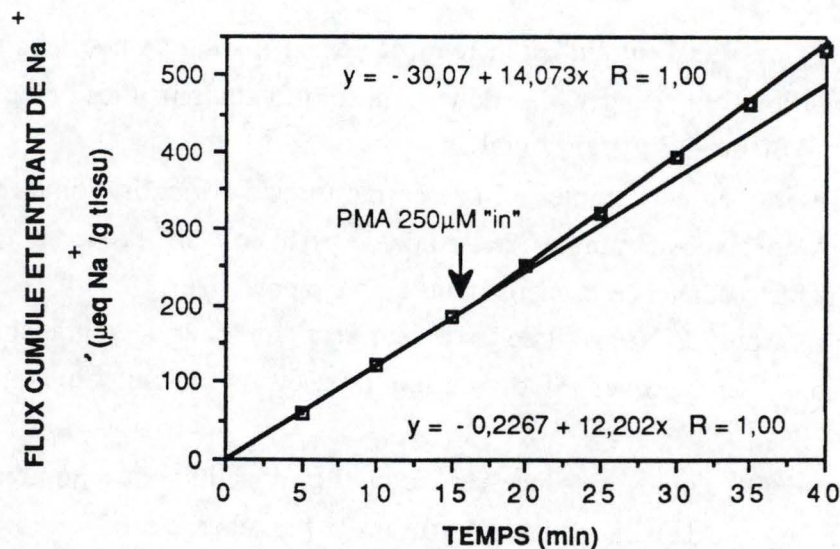


Fig. 12 : Effet du PMA ($250\ \mu\text{M}$), additionné dans le milieu de perfusion ("in"), sur le flux cumulé de $^{22}\text{Na}^+$, dans une branchie postérieure du crabe Chinois *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, on reprend ici les données de la figure 11.

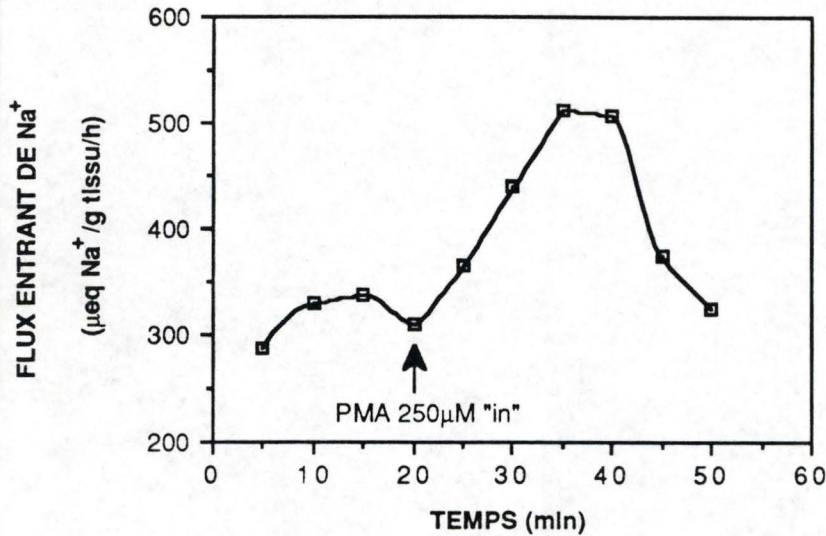


Fig. 13 : Variation en fonction du temps, du flux "entrant" de $^{22}\text{Na}^+$ dans une branchie postérieure du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de PMA (250 μM) dans le milieu de perfusion ("in").

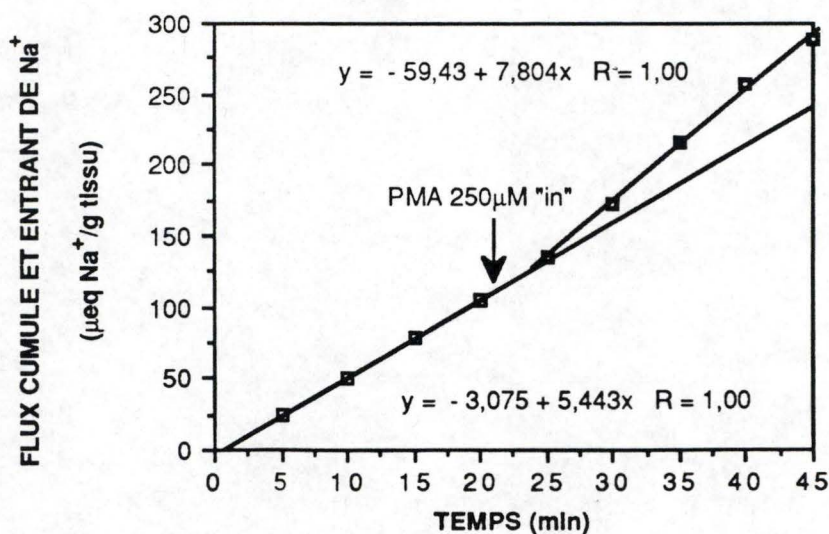


Fig. 14 : Effet du PMA (250 μM), additionné dans le milieu de perfusion ("in"), sur le flux cumulé de $^{22}\text{Na}^+$, dans une branchie postérieure du crabe Chinois *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce. On reprend ici les données de la figure 13.

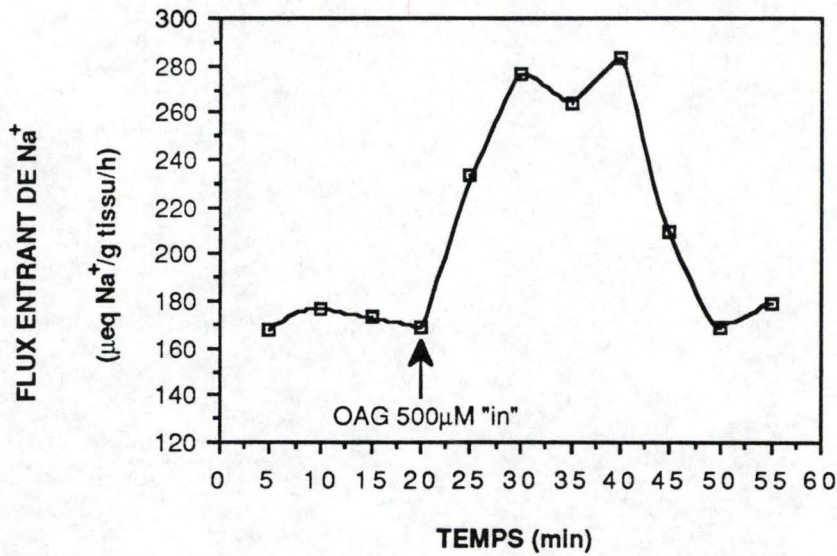


Fig. 15 : Variation en fonction du temps, du flux "entrant" de $^{22}\text{Na}^+$ dans une branchie postérieure du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition d' OAG ($500 \mu\text{M}$) dans le milieu de perfusion ("in").

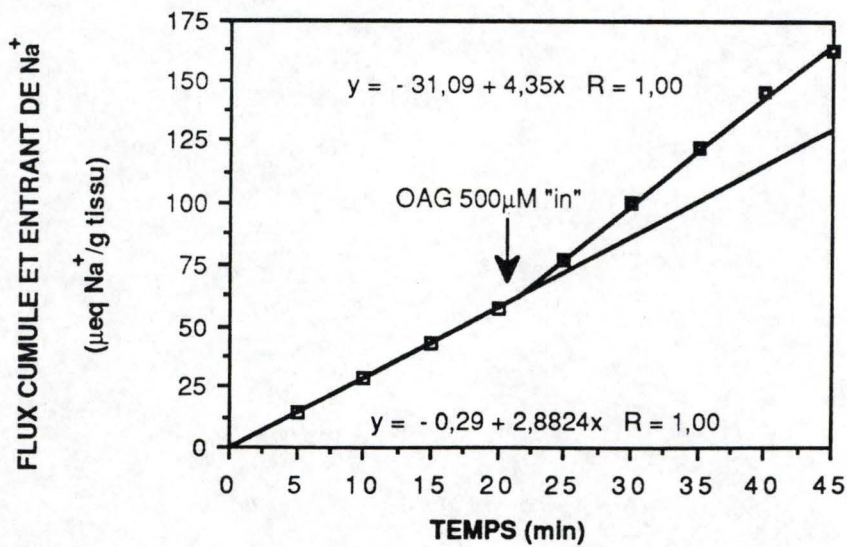


Fig. 16 : Effet, en fonction du temps, de l'addition d'OAG ($500 \mu\text{M}$) à dans le milieu de perfusion ("in") sur le flux cumulé de $^{22}\text{Na}^+$, dans une branchie postérieure du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce. On reprend ici les données de la figure 15.

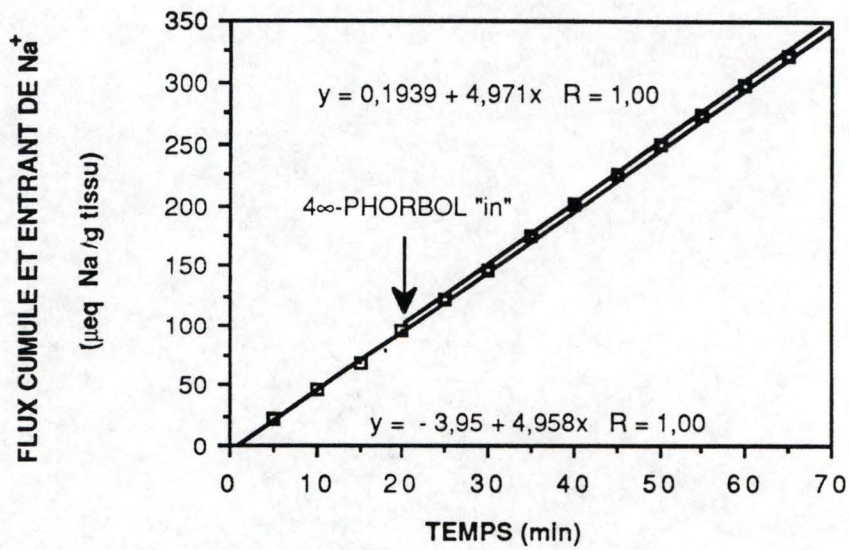


Fig. 17 : Variation, en fonction du temps, du flux cumulé de $^{22}\text{Na}^+$ dans une branche postérieure (isolée et perfusée) du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de 4α - phorbol ($250 \mu\text{M}$) dans le milieu d'incubation ("in").

Le premier active directement la protéine kinase C sans l'intervention de la phosphatidyl sérine.

Le second nécessite l'action simultanée de Ca^{++} et de la phosphatidyl sérine.

Une augmentation de 15 % du flux de $^{22}Na^+$ apparaît lorsque cet ester de phorbol (PMA) 250 μM est appliqué sur la face sérosale, c'est-à-dire lorsqu'il est incorporé dans la solution "in" perfusant de la branchie (Fig. 11).

On peut à nouveau observer que l'effet de l'activateur disparaît après 30 minutes.

Si nous représentons le flux de $^{22}Na^+$ cumulés, nous pouvons connaître, à tout moment, la quantité d'ions Na^+ transitant dans la cellule. Ce graphique (Fig. 12) présente les additions successives des quantités de μeq de Na^+ qui, durant 5 minutes, sont transportées de la face apicale à la face sérosale.

Cette même expérience fut répétée sur une autre branchie. L'accroissement de l'entrée de Na^+ peut se chiffrer à 41 % (Fig. 13 et 14).

Cette augmentation plus importante du flux, (41 % au lieu de 15 %) est peut être la conséquence du fait qu'il existe des différences entre les branchies : on sait que pour certaines, le flux de Na^+ peut être exceptionnellement élevé. Des flux de Na^+ très élevés, ne peuvent plus à ce moment, être fortement activés.

Le PMA ajouté dans le milieu "out" n'a pas engendré de modification du flux de $^{22}Na^+$.

Nous avons également confirmé l'effet lié à la PKc en utilisant un second activateur de la protéine kinase C : le 1 - oleyl - 2 - acétyl - glycérol (diglycéride). Le groupement oleyl rend cette molécule liposoluble et donc capable d'agir sur la protéine kinase C à l'intérieur de la cellule.

Les figures 15 et 16 montrent l'effet important du diacylglycérol (500 μM) se caractérisant par une augmentation de plus de 50 % du flux entrant de Na^+ .

On pourrait imaginer que l'activation par le PMA n'est pas liée à un effet spécifique sur la PKc mais à un effet de cet ester sur la perméabilité de la membrane. Nous avons perfusé des branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce avec un produit apparenté aux esters de phorbol : le 4 α - phorbol, composé qui n'active pas la protéine kinase C [Kojima, I. et al., 1983]. La figure 17 montre que le 4 α - phorbol ne provoque aucun effet sur le flux de $^{22}Na^+$ entrant.

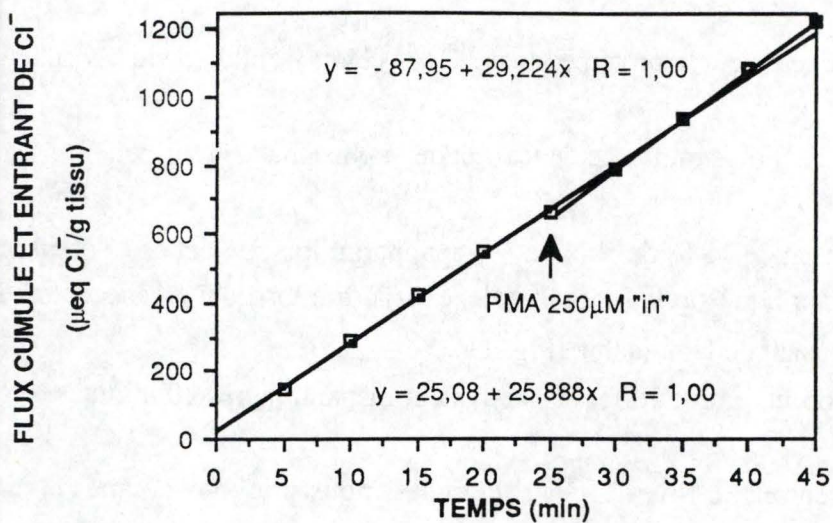


Fig. 18 : Variation, en fonction du temps, du flux cumulé et "entrant" de $^{36}\text{Cl}^-$ dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de PMA ($250 \mu\text{M}$) dans le milieu de perfusion ("in").

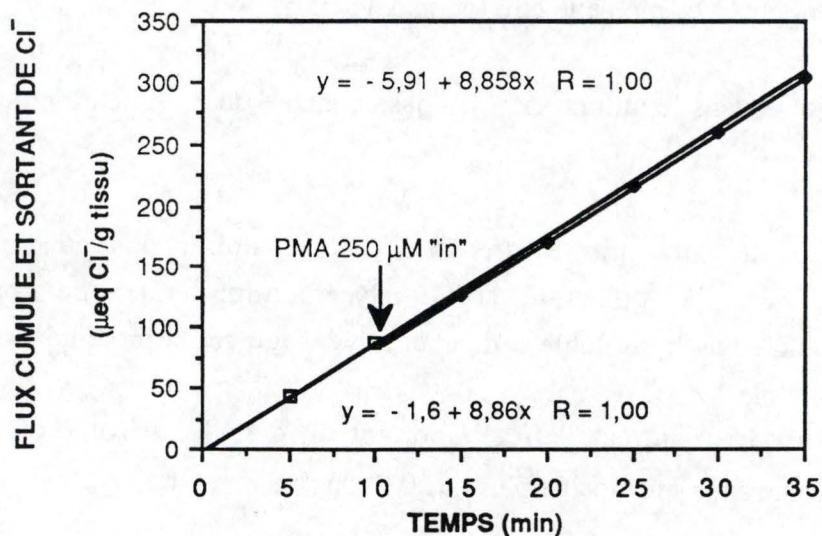


Fig. 19 : Variation, en fonction du temps, du flux cumulé et "sortant" de $^{36}\text{Cl}^-$ dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, lors de l'addition de PMA ($250 \mu\text{M}$) dans le milieu de perfusion ("in").

b. Action des esters de phorbol sur le flux entrant et sortant de $^{36}\text{Cl}^-$

La branchie postérieure est le siège d'un transport de Cl^- aussi bien de la face apicale vers la face sérosale que dans le sens opposé [Pequeux et Gilles, 1988]. Le flux de Cl^- vers l'intérieur (dû à un transport passif et à un transport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ à la face apicale) est nettement plus important que le flux sortant de Cl^- (dû à un transport passif).

Nous avons appliqué le PMA (250 μM) au niveau de la face sérosale (milieu "in") et au niveau de la face apicale (milieu "out"). Aucun effet n'a pu être observé tant sur le flux sortant que sur le flux entrant (Fig. 18 et 19). Ce résultat confirme l'action spécifique du PMA sur la PKc et les transports ioniques et non sur la perméabilité de la membrane.

C. Conclusion

Nous avons pu montrer que les activateurs de la protéine kinase C, placés dans le milieu "in", influencent le transport des ions + et plus particulièrement le Na^+ . Or, à la face sérosale (côté "in"), on sait que le transport ionique est lié à une pompe ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase) et on peut supposer que le PMA et l'OAG activent, par l'intermédiaire de la PKc, cette pompe ionique.

Le transport Na^+/H^+ situé à la face apicale ("out") ne semble pas être influencé par les activateurs de la PKc.

Le transport entrant et sortant des ions - et plus spécialement du Cl^- n'est pas modifié par le PMA.

Les résultats obtenus avec le 4α - phorbol et le flux de Cl^- renforcent l'hypothèse selon laquelle l'activation du flux des ions par l'ester de phorbol et l'OAG n'est pas due à une altération de la perméabilité des membranes, mais est liée à une activation de la PKc.

4.3. Action de la protéine kinase C sur la phosphofructokinase

La régulation du transport ionique via des pompes actives, telle la $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$, nécessite de l'énergie. Cette énergie fournie sous forme d'ATP est largement utilisée pour le maintien de l'équilibre osmotique. La glycolyse est une voie métabolique essentielle qui permet à la branchie de soutenir une activité physiologique de transport adaptée à ses besoins. La glycolyse va permettre la formation de deux molécules d'ATP par l'hydrolyse d'une molécule de glucose.

On sait que trois réactions glycolytiques constituent des barrières énergétiques importantes empêchant la réversibilité de la glycolyse.

L'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase catalysent des réactions thermodynamiquement irréversibles de la glycolyse. Il n'est pas étonnant de constater qu'un contrôle de l'activité catalytique de ces enzymes est indispensable pour expliquer la relation existant entre les besoins énergétiques et l'activité "transportrice" de la branchie.

La phosphofructokinase qui maintient une concentration stable en nucléotides à haute énergie (ATP) est inhibée par un excès d'ATP, mais est stimulée par une augmentation des concentrations intracellulaires en ADP, AMP et P_i .

On a également montré que le contrôle de l'activité de la PFK était lié à la phosphorylation "enzymatique" de cet enzyme [Hofer et al., 1985].

Notre étude vise à tester si la protéine kinase C, en phosphorylant la phosphofructokinase, modifie ces propriétés cinétiques.

a. Matériel biologique

Un homogénat de branchies postérieures, réalisé dans un milieu contenant du fluorure, est centrifugé ($15.000 \times g$) pendant 30 minutes. Le surnageant est laissé 30 minutes à température ambiante avant le dosage de la PFK.

Un second homogénat de branchies postérieures est effectué, mais dans un milieu ne contenant pas de fluorure. Cette solution est également centrifugée ($15.000 \times G$) pendant 30 minutes et laissée 30 minutes à température ambiante.

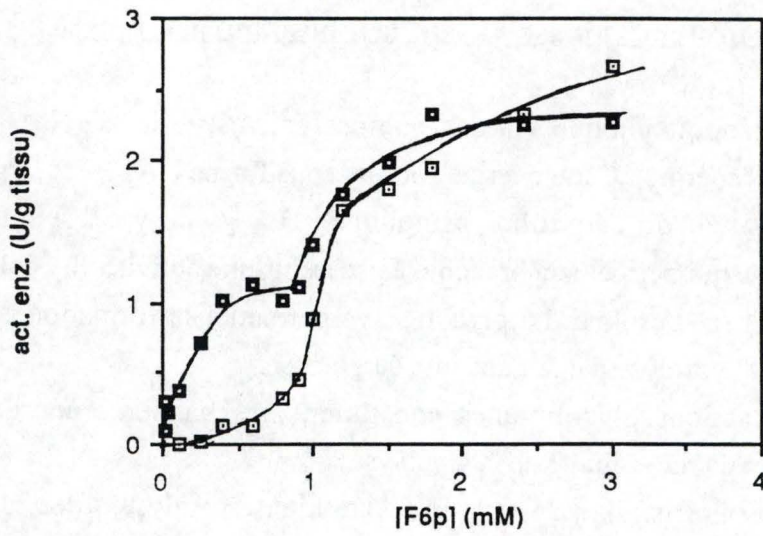


Fig. 20 : Effet de la concentration en Fru - 6 - p sur l'activité de la phosphofructokinase dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce avec (■) et sans (□) KF (100 mM) dans le milieu d'incubation.

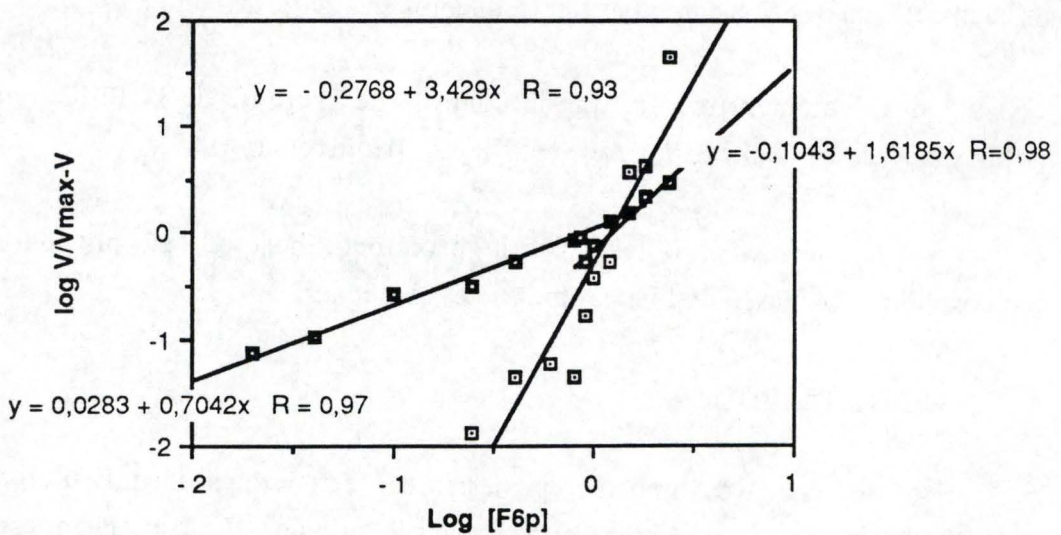


Fig. 21 : Linéarisation des courbes de la figure précédente (Fig. 20) par la transformation de Hill. (■) : act. enz. avec KF - (□) : act. enz. sans KF.

Le fluorure est utilisé comme inhibiteur de phosphatases. Après incubation à température ambiante, nous réalisons le dosage de l'activité enzymatique de la PFK comme décrit précédemment (3.2.3.).

b. Résultats

La figure 20 montre clairement que des cinétiques différentes apparaissent lorsque l'extrait est homogénéisé et incubé avec ou sans KF. En présence de KF, la PFK présente une courbe de saturation vis-à-vis du Fru - 6 - p de type Michaelis-Menten, alors qu'en l'absence de KF, nous observons une courbe de type sigmoïde caractéristique d'un enzyme à régulation allostérique.

La transformation de Hill nous montre le caractère intermédiaire, entre une courbe sigmoïde et une courbe de Michaelis-Menten, de la PFK incubée en présence de KF [Fig. 21]. Hofer en 1985, postule que, chez les mammifères, cette modification est liée à la phosphorylation de la PFK. La forme sigmoïde, représentant la PFK incubée en l'absence des inhibiteurs des phosphatases (fluorure), caractériserait la forme déphosphorylée de la PFK.

La PFK incubée en présence de fluorure (inhibiteurs des phosphatases) représenterait la forme phosphorylée avec une courbe de saturation vis-à-vis du Fru - 6 - p de type Michaelis-Menten.

On retrouve ces mêmes propriétés au niveau de la branchie postérieure du crabe.

Nous avons incubé la PFK, 30 minutes en l'absence de KF (fluorure), comme décrit précédemment. Nous ajoutons ensuite, la dioléine, la phosphatidyl sérine (P S) et le Ca^{++} ainsi que du Mg - ATP.

Le "contrôle" est incubé en l'absence de P S (la PKc n'est pas activée). La figure 22 montre que la PFK incubée en présence de Ca^{++} et de dioléine, mais en l'absence de P S, présente une cinétique de type sigmoïde. Par contre, l'activité de la PFK, en présence de tous les activateurs de la PKc et de l'ATP montre une cinétique de type Michaelis-Menten.

Nous pensons que cette modification est liée à la protéine kinase C et à la phosphorylation de la PFK par la PKc.

La transformation de Hill nous révèle comme précédemment, le caractère intermédiaire de la PFK incubée en présence de Ca^{++} , dioléine et phosphatidyl sérine.

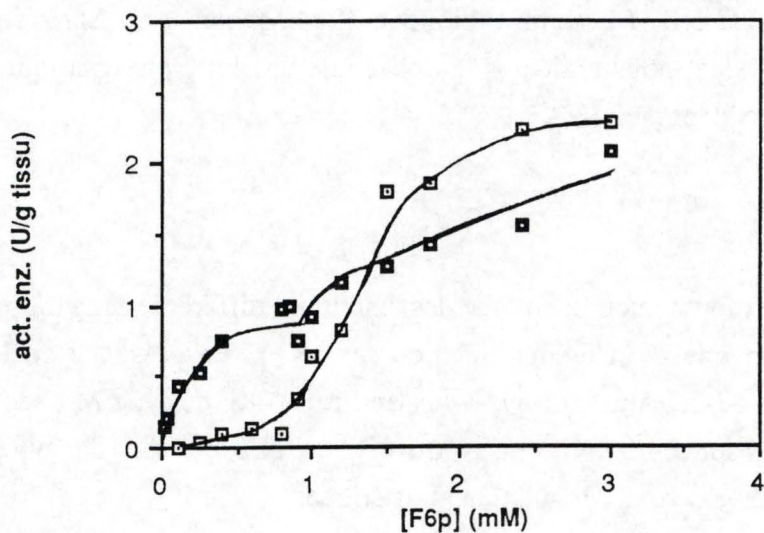


Fig. 22 : Effet de la concentration en Fru- 6 - p sur l'activité de la phosphofructokinase dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, avec (■) ou sans (□) P S (50 µg/ml) dans le milieu d'incubation qui contient du Ca⁺⁺ (0,5 mM), de la dioléine (0,5 µg/ml) et du Mg-ATP (120 µM).

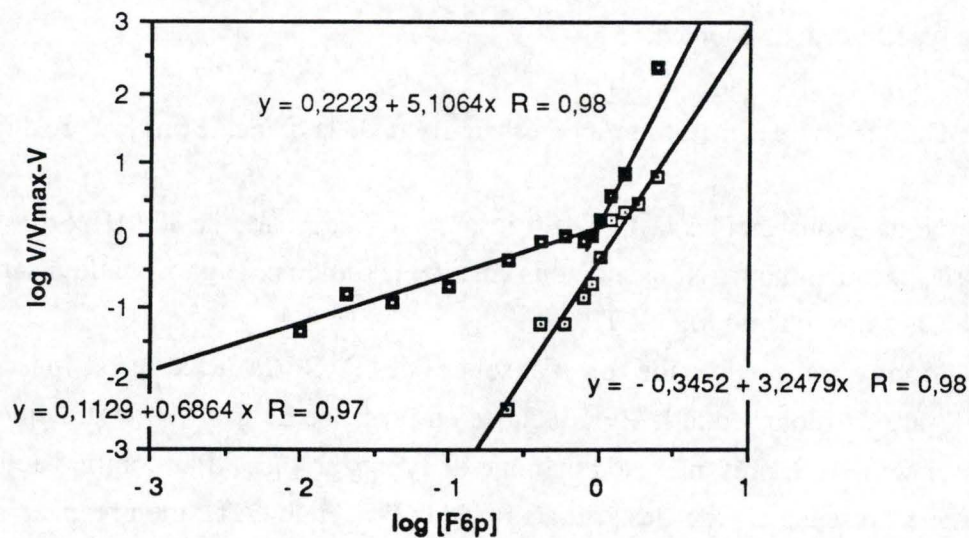


Fig. 23 : Linéarisation des courbes de la figure précédente (Fig. 22) par la transformation de Hill. (■) : act. enz. avec PS - (□) : act. enz. sans PS.

C. Conclusion

Nous avons pu observer une différence dans le cinétique de saturation de la PFK au Fru - 6 - p, selon que l'extrait soit homogénéisé et incubé en présence de KF (courbe Michaelis-Menten) et en l'absence de KF (courbe sigmoïde). Cette différence devrait être liée à l'effet de phosphorylation de la PFK.

Le même résultat est observé lorsque des activateurs de la PKc (Ca^{++} , dioléine et PS) et de l'ATP sont présents dans le milieu d'incubation.

Nous pensons que cette modification dans la courbe de saturation au Fru - 6 - p est liée à l'intervention de la PKc qui en phosphorylant la PFK modifierait ainsi ses propriétés cinétiques.

4.4. Phosphorylation des protéines membranaires

a. Matériel biologique

La structure des branchies postérieures et antérieures est assez différente. Cette différence apparaît notamment au niveau du nombre nettement plus élevé de replis à la face apicale et basale des branchies postérieures.

Nous avons par ailleurs observé que le contenu en protéines des branchies antérieures est différent de celui des branchies postérieures.

Si les activateurs de la PKc modifient les flux d'ions, on peut imaginer que ces modifications membranaires impliquent aussi des phosphorylations de protéines membranaires.

Nous incubons, en présence de [γ - ^{32}P]-ATP, un surnageant obtenu, par centrifugation (3000 x g) pendant 30 minutes, d'un homogénat de branchies antérieures et postérieures, avec ou sans activateurs de la PKc (Ca^{++} , dioléine et phosphatidyl sérine). Après 15 minutes d'incubation, nous ajoutons dans les milieux d'incubation, un excès d'ATP (11 mM final) afin d'arrêter la réaction de phosphorylation.

Les milieux d'incubation sont alors soumis à une centrifugation à 100.000 x g pendant 30 minutes et les culots sont resuspendus dans de l'acétone froid. Nous recentrifugeons ces derniers à 9.200 x g pendant 5 minutes et le culot de protéines est resuspendu dans un tampon (tris-HCl 50 mM PH 6,8) pour l'électrophorèse.

Nous déposons sur un gel de polyacrylamide une quantité de protéines identique pour les branchies postérieures et antérieures.

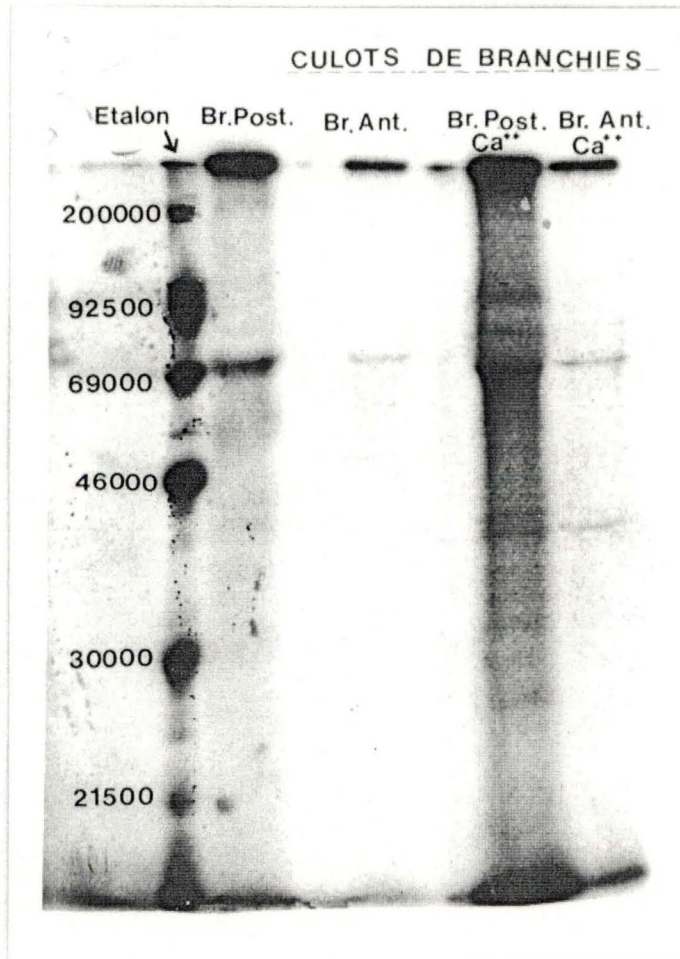


Fig. 24 : Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide sur lequel a été déposé des protéines, associées aux structures subcellulaires de branchies postérieures et antérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté en eau douce, phosphorylées en présence ou non de Ca^{++} , phosphatidyl sérine et dioléine.

L'électrophorèse terminée, le gel est mis en contact avec une plaque photographique XAR - 5 pendant 9 jours ; les protéines ayant incorporé du ^{32}P émettent des rayonnements β qui impriment la plaque photographique.

Après phosphorylation, les milieux d'incubation sont également déposés sur un papier filtre Whatman P 81 et lavés 5 fois avec l'acide orthophorique. Ces papiers sont placés dans une fiole où l'on ajoute 4 ml d'Aqualuma Plus et ces fioles sont mises dans le compteur à scintillation

b. Résultats

Branchie antérieure (^{32}P incorporées CPM/mg de protéines)		Branchie postérieure (^{32}P incorporées CPM/mg de protéines)	
sans $\text{Ca}^{++}/\text{PS}/\text{D}$	avec $\text{Ca}^{++}/\text{PS}/\text{D}$	sans $\text{Ca}^{++}/\text{PS}/\text{D}$	avec $\text{Ca}^{++}/\text{PS}/\text{D}$
2843	3634	4358	14.119

On peut observer une faible augmentation de la phosphorylation dans les branchies antérieures lorsque la phosphorylation est réalisée en présence des activateurs de la PKc (Ca^{++} , P S et dioléine).

Par contre, une augmentation du ^{32}P incorporées, assez remarquable, est visible dans les branchies postérieures.

Ce résultat est confirmé par l'autoradiographie où nous apercevons une différence aussi bien au niveau des branchies postérieures que des branchies antérieures dans l'incorporation de ^{32}P sur les substrats endogènes en l'absence et en présence des composés qui stimulent l'activité de la PKc ($\text{Ca}^{++}/\text{PS}/\text{dioléine}$).

Cette augmentation est beaucoup plus importante dans les branchies postérieures (Fig. 24).

En outre, dans le cas des branchies antérieures, seulement deux bandes sont visibles et l'intensité de ces bandes est nettement plus faible que celle des branchies postérieures où le nombre de bandes est très élevé.

Plus d'une dizaine de protéines dans les branchies postérieures sont phosphorylées par la PKc. Nous pouvons, au vu de ces résultats, suspecter une différence quantitative et qualitative des protéines phosphorylées par la PKc dans la fraction cellulaire (entre 3.000 et 100.000 x g) entre les deux types de branchies.

**DISCUSSION GENERALE
&
PERSPECTIVES**

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le crabe Chinois *Eriocheir sinensis* est un crustacé euryhalin qui maintient l'osmolarité de son hémolymphe constante quelque soit le milieu environnant. La croissance de ce crabe se réalise en eau douce et par contre, les femelles ovigères ne supportent pas un séjour prolongé en eau douce, mais remontent en eau de mer pour la reproduction en automne. Le maintien des différents équilibres osmotiques est notamment contrôlé par la diffusion de substances et par des transports ioniques actifs et passifs (Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ et HCO_3^-) à travers les parois branchiales [Pequeux et Gilles, 1981].

Les branchies du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, ont une particularité très intéressante : les trois paires de branchies postérieures sont concernées dans le transport ionique et les trois paires antérieures interviennent dans la respiration [Barra et al., 1983].

Cette dissociation de fonctionnalité a orienté notre recherche vers une étude comparée de la biochimie et de la physiologie des branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

Pequeux et Gilles (1981) ont montré que les principales pompes ioniques intervenant dans le contrôle de l'osmorégulation chez le crabe sont la (Na^+ - K^+)-ATPase située à la face sérosale et les transports Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ situés à la face apicale des branchies postérieures.

D'autre part, il a été démontré que, chez les mammifères, l'activité enzymatique de la (Na^+ - K^+)-ATPase et le transport Na^+/H^+ sont contrôlés par la protéine kinase C [Lynch et al., 1986] [Siffert et Akkerman, 1988]. Cette kinase, activée en présence de phospholipides et de calcium, phosphoryle la (Na^+/K^+)-ATPase produisant ainsi une activation de celle-ci [Green et Lattimer, 1986]. Nous pensons que le contrôle de l'activité des "pompes ioniques" membranaires est lié à l'activité phosphorylante de la PKc sur les protéines de la membrane.

Dans un premier chapitre, nous avons vérifié l'existence de la protéine kinase C dans les branchies postérieures et antérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

La mise au point de la méthodologie a été effectuée sur le cerveau de souris, décrit comme un tissu très riche en protéine kinase C.

Aussi bien dans les branchies postérieures qu'antérieures, nous avons pu observer, lorsque le calcium (0,5 mM), la dioléine (0,5 µg/ml) et la phosphatidyl sérine (50 µg/ml) sont ajoutés dans le milieu d'incubation, une nette augmentation de la phosphorylation de l'histone H₁ (substrat décrit comme spécifique de la PKc) par rapport à l'activité basale (sans Ca⁺⁺, dioléine et PS).

Sans phosphatidyl sérine, cette augmentation ne se produit plus. Nous avons constaté le caractère extemporané du dosage : une fraction conservée 24 heures à 4° C ou congelée ne montre plus de phosphorylation activée par le Ca⁺⁺, la dioléine et la phosphatidyl sérine. Par contre, la phosphorylation basale reste présente.

Il est difficile de comparer les branchies antérieures et les branchies postérieures : la mesure de l'activité enzymatique est réalisée sur des surnageants, or on sait que la protéine kinase C activée est membranaire. Donc, ne connaissant pas le degré d'activation de la PKc dans ces deux types de branchies, il nous paraît difficile de comparer les activités enzymatiques.

Néanmoins, le fait d'obtenir une stimulation de la phosphorylation de l'histone H₁ sensible à la PS (activateur spécifique de la PKc), nous permet d'affirmer que la protéine kinase C est présente dans les branchies du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

Les esters de phorbol sont des activateurs de la protéine kinase C. Nous avons utilisé cette propriété pour tenter d'établir une relation entre la PKc et le transport ionique. La perfusion de branchies constitue une méthodologie intéressante pour étudier les flux d'ions [Pequeux et Gilles, 1981].

L'addition dans le milieu de perfusion ou milieu "in" (passant dans la branchie) d'un activateur de la PKc tel que le PMA (250 µM), provoque sur des branchies, isolées et perfusées, du crabe *Eriocheir sinensis*, une dépolarisation d'environ 10 mVolt indiquant une activation du flux "entrant" des ions +. Ce composé ajouté dans le milieu où baigne la branchie ou milieu "out" n'induit pas d'effet.

La perfusion des branchies avec l'isotope ²²Na⁺ met en évidence une activation du transport de cet ion de la face externe ("out") vers la face interne ("in") d'environ 40 % en présence de PMA (250 µM) et de l'OAG (500 µM) dans le milieu "in". Par contre, le flux de ³⁶Cl⁻ n'est pas modifié par ces constituants lorsqu'ils sont appliqués aussi bien à la face sérosale ("in") qu'à la face apicale ("out").

Ces résultats démontrent que des activateurs de la protéine kinase C modifient le transport des ions $+$, et plus exactement le Na^+ , à la face sérosale, des branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce.

Nous pensons que cet effet est bien lié à l'activation de la protéine kinase C et non à une modification de la perméabilité. En effet, si nous perfusions avec un produit apparenté aux esters de phorbol (le 4 α -phorbol) qui lui n'active pas la PKc, on ne modifie pas le flux de Na^+ (Fig. 17).

Le résultat du flux "sortant" de Cl^- confirme cette spécificité de la réaction, car si la perméabilité avait été modifiée par le PMA, nous aurions dû observer une variation du flux de Cl^- , or cela ne se produit pas (Fig. 19).

Il est évident, que le transport actif dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, requiert de l'énergie. La glycolyse représente un des processus permettant de réguler les réserves énergétiques contrôlant constamment le niveau des nucléotides à haute énergie (ATP). Un des enzymes clefs de la voie d'Embden-Meyerhof est la phosphofructokinase(PFK).

Nous avons pu montrer pour la première fois, chez le crabe, que la présence de KF dans le milieu d'incubation modifie les propriétés cinétiques de la PFK visible par les courbes de saturation au Fructose - 6 - p (substrat de la PKc).Hofer en 1985, postule que cette modification, du moins chez les mammifères, est liée à la phosphorylation de cet enzyme par les kinases. La forme sigmoïde, représentant la PFK incubée sans KF (inhibiteur des phosphatases), caractériserait la forme déphosphorylée de l'enzyme alors que, la PFK incubée en présence de KF, représenterait la forme phosphorylée avec une courbe de saturation vis-à-vis du Fru - 6 - P de type Michaelis-Menten.

Lorsque nous incubons la phosphofructokinase avec ou sans activateur de la PKc (Ca^{++} , dioléine et PS) en présence de Mg - ATP, nous observons une courbe de saturation hyperbolique caractéristique d'une cinétique de type Michaelis-Menten. Sans PS, la courbe de saturation au Fru - 6 - P est de type sigmoïde.Nous pensons que cette transition dans la cinétique de saturation au Fru - 6 - P est liée à la présence d'une structure déphosphorylée de la PFK (courbe sigmoïde) qui s'est rephosphorylée par la présence de Ca^{++} , dioléine et PS (activateurs de la PKc).

Nous venons de montrer que des activateurs de la PKc modifiaient le transport ionique du Na^+ au niveau de la face "in" des branchies postérieures du crabe

Eriocheir sinensis, acclimaté à l'eau douce et l'activité catalytique d'un enzyme contrôlant le métabolisme de l'ATP et donc des pompes ioniques.

Nous avons envisagé l'hypothèse suivant laquelle "l'activité" de ces transporteurs pourrait être liée à la possibilité d'une phosphorylation, via des protéines kinases, des protéines membranaires.

Nous avons incubé une fraction subcellulaire de branchies du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, sédimentant entre 3000 et 100.000 x g, en présence de [γ - ^{32}P] - ATP. Nous démontrons que des activateurs de la PKc (Ca^{++} , dioléine et PS) stimulent l'incorporation de ^{32}P essentiellement dans les branchies postérieures. Une différence fondamentale apparaît quant au nombre de protéines phosphorylables et phosphorylées dans les branchies postérieures et antérieures. Dans les premières, l'autoradiographie met en évidence un grand nombre de protéines phosphorylées. Au moins, une dizaine de bandes impressionnent la plaque photographique. Par contre, dans les branchies antérieures, l'augmentation des phosphorylations en présence de Ca^{++} , de dioléine et de PS est assez faible et, seulement deux bandes apparaissent sur l'autoradiographie. Ce résultat nous montre donc une différence entre les deux types de branchies. Un nombre très important de protéines phosphorylables et phosphorylées sont présentes dans les branchies postérieures, alors que cela ne s'observe pas dans les branchies antérieures.

Cet ensemble de résultats nous ouvre de nombreuses et passionnantes perspectives.

Nous pensons que l'adaptation d'un organisme à un stress osmotique influence profondément la nature de son habitat possible et donc, sa dispersion géographique.

Le crabe *Eriocheir sinensis* possède un ensemble de métabolisme très particulier et la branchie de ce crabe offre un outil idéal pour l'étude de la régulation osmotique.

Il est évident, que l'adaptation à court terme implique un contrôle de l'activité des transporteurs ioniques membranaires liés à un ensemble de kinases intracellulaires. Celles-ci modifient l'état des transporteurs par leur activité phosphorylante. A ce sujet, des études centrées sur la ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)-ATPase où le transport Na^+/H^+ nous semble intéressantes.

L'inclusion de ces diverses pompes ou transporteurs purifiés dans des vésicules membranaire reconstituées, permettrait l'étude de ces transports ioniques.

On peut imaginer un contrôle au niveau de l'environnement structural de cet enzyme.

En 1986, Chapelle a démontré qu'il existe une variation des phospholipides membranaires au cours de l'année. Or, on remarque également, en fonction des saisons, une variation du contrôle de l'osmorégulation.

Au-delà de cette régulation, on peut supposer le contrôle de la phosphorylation de la (Na⁺ - K⁺)-ATPase par les protéines kinases.

Quel peut être le rôle des différentes protéines kinases sur l'activité transportrice de vésicules reconstituées ?

- Le rôle des bioamines qui contrôlent l'AMPc intracellulaires et la PKa pourraient être étudiées sur ce système en relation avec la PKc
- Le rôle de l'environnement phospholipidique sur le contrôle par le Ca⁺⁺ et la PKc sur ce transport serait à approfondir

Il est clair que pour un organe tel que la branchie postérieure du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, le taux du métabolisme cellulaire est essentiellement lié au transfert des ions le long de voies ioniques spécifiques qui par exemple bloqué réduit considérablement les besoins énergétiques (ATP). Les recherches doivent se diriger vers cette combinaison "adaptable" entre le fonctionnement métabolique et le fonctionnement des membranes.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Almeida, F. (1985)

"Characterizing osmotically-induced Na, K - ATPase from *Callinectes sapidus*
Comp. Biochem. Physiol. 82A, 189-192.

Altin, J.C., Bygrave, F.L. (1988)

"Second messengers and the regulation of Ca²⁺ fluxes by Ca²⁺ - mobilizing agonists
in rat liver"
Biol. Rev. 63, 551-611.

Ashendel, C.L. (1985)

"The phorbol ester receptor : a phospholipid - regulated protein kinase"
Biochimica and Biophysica Acta 822, 219-242.

Bauchau, A. (1966)

"La vie des crabes"
Ed. Lechevalier (Paris) .

Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1984)

"Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction"
Nature 312, 315 - 321.

Barra, J.A., Pequeux, A., Humbert, W. (1983)

"A morphological study on gills of crab acclimated to fresh water"
Tissue Cell 15, 583-596.

Bielawski, J. (1971)

"Ultrastructure and ion transport in gill epithelium of the Crayfish, *Astacus leptodactylus* Esch"
Protoplasma 73, 177-190.

Bittar, E.E. and Gerard, P.R. (1987)

"Evidence for the presence of protein kinase C in barnacle muscle fibers"
Comp. Biochem. Physiol. 88B, 687-690.

Berthon, B., Binet, A., Mauger, J., Claret, M. (1984)

"Cytosolic free Ca^{2+} in isolated rat hepatocytes as measured by Quin"

F.E.B.S. Lett. 167, 19-24

Bolton, T.B., (1979)

"Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle"

Phys. Rev. 59, 606-718.

Boni, L.T., Rando, R.R. (1985)

"The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols"

J. Biol. Chem. 260, 10819-10825.

Castano, J.G., Nicot, A. and Feliu, J.E. (1979)

"Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes"

J. Biol. Chem. 254, 5576-5579.

Chapelle, S. (1986)

"Aspects of phospholipid metabolism in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities"

Comp. biochem. physiol. 84B, 423-439.

Conte, F.P., Droukas, P., Erwing, R. (1977)

"Development of sodium regulation and de novo synthesis of Na + K - activated ATPase in larval brine shrimp, *Artemia salina*"

J. Exp. Zool. 202, 339-361.

Copeland, D.E. (1964)

"Salt absorbing cells in gills crabs *Callinectes* and *Carcinus*"

Biol. Bull. 127, 367-368

Copeland, D.E. (1968.a)

"Fine structure of salt and water uptake in the land crab, *Gecarcinus lateralis*"

Ann. Zool. 8, 417-432.

Copeland, D.E., Fitzjarrell, A.T. (1968. b)

"The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes of modified mitochondria"

Z. Zellforsch 92, 1-22.

Delbeke, D., Kojima, I., Dannies, P.S. and Rasmussen, H. (1984)

"Synergistic stimulation of prolactin release by phorbol ester, A23187 and forskolin"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 735-741.

Durell, J. ; Garland, J.T., Friedel, R.O. (1969)

"Acetylcholine action : biochemical aspects"

Science 165, 862-866.

Evans, D.H. (1977)

"Further evidence of Na⁺/NH₄⁺ exchange in marine teleost fish"

J. Exp. Biol. 70 , 213-220.

Exton, J.H. (1988)

"Mechanisms of action of calcium - mobilizing agonists : some variations on a young theme"

FASEB J. 2, 2670-2676.

Fox, A.P., Novycky, M.C. and Tsien, R.W. (1987/ a and b)

"Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory Neurons"

J. Physiol. 394, 149-172.

Gerard, J.F. and Gilles, R. (1972)

"Modification of the amino-acid efflux during the osmotic adjustment of isolated axons of *Callinectes sapidus* "

Experientia 28, 863-864.

Gilman, A.G. (1970)

"A protein binding assay for 3' : 5'-cyclic monophosphate"

Proc. Natl. Acad. Sci. 67 (1), 305-312.

Go, M., Sekiguchi, K., Nomura, H., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987)
"Further studies on the specificity of diacylglycerol for protein kinase C activation"
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 144, 598-605.

Greene, D.A. and Lattimer, S. (1986)
"Protein kinase C agonists acutely normalize decreased ouabain - inhibitable
respiration in diabetic rabbit nerve : implications for (Na, K) ATPase regulation and
diabetic complications (rapid publications)"
Diabetes 35, 242-245.

Gusovsky, F., Hollingsworth, E.B. and Daly, J.W. (1986)
"Regulation of phosphatidylinositol turnover in brain synaptoneurones : stimulatory
effects of agents that enhance influx of sodium ions"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3003-3007.

Hannun, Y.A., Loomis, C.R. and Bell, R.M. (1985)
"Activation of protein kinase C by triton X - 100 mixed micelles containing
diacylglycerol and phosphatidyl serine"
J. Biol. Chem. 260, 10039-10043.

Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill (Jr), A.H. and Bell, R.M. (1986)
"Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding
in vitro and in human platelets"
J. of Biol. Chem. 261, 12604-12609.

Hirasawa K., Irvine, R.F. and Dawson, R.M.C. (1982)
"Heterogeneity of the calcium-dependent phosphatidyl-inositol phosphodiesterase in
rat brain"
Biochemical Journal 205, 437-442.

Hishikawa, R., Fukase, M., Yamatani, T., Kadowaki, S., Fujita, T. (1985)
"Phorbol ester stimulates calcitonin secretion synergistically with A23187, and
additively with dibutyryl cyclic AMP in a rat C - cell line"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 424-429.

Hofer, H.W. (1985)

"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 .

Hofer, H.W. , Schlatter, S. and Graefe, M. (1985)

"Phosphorylation of phosphofructokinase by protein kinase changes the allosteric properties of the enzymes"

Biochem. Biophys. Res. Commun. , 129, 892-897.

Hokin, M.R., Hokin, L.E. (1953)

"Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipids of pancreatic slices"

J. Biol. Chem. 203, 967-977.

Hootman, S.R., Brow, M.E. and Williams, J.A.(1987)

"Phorbol esters and A23187 regulate Na^+ - K^+ - pump activity in pancreatic acinar cells"

Am. J. Physiol. 252, G499-505.

Huang, W. , Askari, A. (1982)

" Ca^{2+} - dependent activities of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ "

Arch. Biochem. Biophys. 216, 741-750.

Huang, K.P. ; Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986)

"Isozymic forms of rat brain Ca^{2+} - activated and phospholipid - dependend protein kinase"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8535-8539.

Huang, F.L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H., Knopf, J.L., Young, W.S. and Huang, K.P. (1987. a)

"Immunochemical identification of protein kinase C isozymes as products of discrete genes"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 946-952.

Huang, F.L., Yoshida, Y., Nakabayashi, H. and Huang, K.P. (1987. b)
"Differential distribution of protein kinase C isozymes in the various regions of brain"
J. Biol. Chem. 262 15714-15720.

Jefrey, A.M., Liskamp, R.J.M. (1986)
"Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters : rationale for the activity
of phorbol esters, teleocidin β and aplysiatoxin"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 241-245.

Kaczmarek, L.K. (1987)
"The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter
release"
T.I.N.S. 10, 30-34.

Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijma, M., and Fujikura, T. (1983)
"Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilisation in platelet
activation"
J. Biol. Chem. 258, 6701-6704.

Kaibuchi, K., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1985)
"Protein kinase C and calcium ion in mitogenic response of macrophagedepleted
human peripheral lymphocytes"
J. Biol. Chem. 260, 1366-1369

Kajikawa, N., Kaibuchi, K., Matsubara, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.
(1983)
"A possible role of protein kinase C in signal-induced lysosomal enzyme release"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 743-750.

Kamemoto, E.S. and Mansour, T.E. (1986)
"Phosphofructokinase in the fluke *Fasciola hepatica*. Purification and kinetic changes
by phosphorylation"
J. Biol. Chem. 261, 4346-4351.

- Katakami, Y., Kaibuchi, K., Sawamura, M., Takai, Y., Nishizuka, Y. (1984)
"Synergistic action of protein kinase C and calcium for histamine release from rat peritoneal mast cells"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 573-578.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. and Nishizuka, Y. (1982)
"Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification and properties"
J. Biol. Chem. 257, 13341-13348.
- Kikkawa, U. ; Minakuchi, R. ; Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1983)
"Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) from rat brain"
Methods in enzymology 99, 288-299.
- Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1986)
"The role of protein kinase C in transmembrane signalling"
Ann. Rev. Cell. Biol. 2, 149-178.
- Kirsch, D., Obermaier, B. and Häring, H.U. (1985)
"Phorbol esters enhance basal D-glucose transport but inhibit insulin stimulation of D-glucose transport and insulin binding in isolated rat adipocytes"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 824-832.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1980)
"Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover"
J. Biol. Chem. 255, 2273-2276.
- Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y. and Nishizuka, Y. (1985)
"Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine - 3', 5' - monophosphate - dependent protein kinase"
J. Biol. Chem. 260, 12492-12499.

Knight, D.E., Niggli, V. and Scrutton, M.C. (1984)
"Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca²⁺"
Eur. J. Biochem. 143, 437-446.

Koch, H.J. (1934)
"Essai d'interprétation de la soi-disant réduction vitale des sels d'argent par certains organes d'arthropodes"
Ann. Soc. Sci. Med. Nat. Brux. Ser. 54, 346-361.

Kojima, I., Lippes, H., Kojima, K. and Rasmussen, H. (1983)
"Aldosterone secretion : Effect of phorbol ester and A23187"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 555-562.

Krebs, E.G. (1985)
"The phosphorylation of proteins : a major mechanism for biological regulation"
Bioch. Soc. T. 13 (5), 813-820.

Krogh, A. (1938)
"The active absorption of ions in some fresh water animals"
Z. Vergl. Physiol. 25, 335-350.

Kulkarni, G., Rao, G.S.J., Srinivasan, N.G.S., Hofer, H.W., Yuan, P.M. & Harris, B.G. (1987)
"*Ascaris suum* phosphofructokinase phosphorylation by protein kinase and sequence of the phosphopeptide"
J. Biol. Chem. 262, 32-34.

Laemmli, U.K. (1970)
"Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄"
Nature 227, 680-685.

Lagrange, J.L., Marie, J., Cottreau, D., Fischer, S. & Kahn, A. (1980)
"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.

Lincoln, T.M. , Flockhart, D.A. and corbin, J.D. (1986)

"Studies on the structure and mechanism of activation of the guanosine 3', 5' -
monophosphate - dependent protein kinase"

J. Biol. Chem. 261, 1208-1214.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)

"Protein measurement with Folin phenol reagent"

J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lynch, C.J., Wilson, P.B. Blackmore, P.F. and Eston, J.H. (1986)

"The hormone-sensitive hepatic Na⁺ - pump"

J. Biol. Chem. 261, 14551-14556.

Mantel, L.H. and Farmer, L.L. (1983)

"Osmotic and ionic regulation"

in : Mantel L.H. (ed.) The biology of crustacea (Dorothy Bliss, editor-in-chief),
Vol. 5 Academic Press, London New York : 53-161.

Mattson, M.P. and Spaziani, E. (1987)

"Demonstration of protein kinase C activity in crustacean Y - organs, and partial
definition of its role in regulation of ecdysteroidogenesis"

Molecular and Cellular Endocrinology 49, 159-171.

Merril (Jr), A.H. and Stevens, V.L. (1989)

"Modulation of protein kinase C and diverse cell functions by sphingosin - a
pharmacologically interesting compound linking sphingolipids and signal transduction"

Biochimica and Biophysica Acta 1010, 131-139.

Merrit, J.E. and Rubin, R.P. (1985)

"Pancreatic amylase secretion and cytoplasmic free calcium. Effect of ionomycin,
phorbol dibutyrate and diacylglycerols alone and in combination"

Biochem. J. 230, 151-159.

Michell, R.H. (1975)

"Inositol phospholipids and cell surface receptor function"

Biocim. Biophys. Acta 415, 81-147.

Mieskes, G., Kuduz, J., Söling, H.D. (1987)

"Are calcium - dependent protein kinase 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.

Murray, A.W., Fournier, A. and Hardy, S.J. (1987)

Proteolytic activation of protein kinase C : physiological reaction ?"

T.I.B.S. 12, 53-54.

Naka, M. , Nishikawa, M. , Adelstein, R.S. , Hidaka, H. (1983)

"Phorbol ester-induced activation of human platelets is associated with protein kinase C phosphorylation of myosin light chains"

Nature 306, 490-492.

Neufeld, G.J., Holliday, Ch. W. , Pritchard, J.B. (1980)

"Salinity adaptation of gill (Na, K)-ATPase in the blue crab *Callinectes sapidus*"

J. Exp. Zool. 211, 215-224.

Nishizuka, Y. (April 1984)

"The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion"

Nature Vol. 308, 693-698.

Nishizuka, Y. (1986)

"Studies and perspectives of protein kinase C"

Science Vol. 233, 305-312.

O'Brien, T.G., George, K. and Prettyman, R. (1988)

"Protein kinase C and membrane transport : divergent responses of $Na^+/K^+/Cl^-$ cotransport and sugar transport to exogenous diacylglycerol"

Biochem. Biophys. Acta 945, 41-50.

Orr, G.L., Gole, J.W.D., Gupta, J. and Downer, R.G.H. (1988)

"Modulation of octopamine-mediated production of cyclic AMP by phorbol-esters sensitive protein kinase C in an insect cell line"

Biochimica and Biophysica Acta 970, 324-332.

- Otani, S., Matsui, I., Kuramoto, A. and Morisawa, S. (1985)
"Induction of ornithine decarboxylase in guinea-pig lymphocytes. Synergistic effect of diacylglycerol and calcium"
Eur. J. Biochem. 147, 27-31.
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ulrich, A. (1986)
"The complete primary structure of protein kinase C - the major phorbol ester receptor"
Science 233, 853-859.
- Pavoine, C., Lotersztajn, S., Mallat, A. and Pecker, F. (1987)
"The high affinity (Ca^{2+} - Mg^{2+} -) ATPase in liver plasmamembranes in a Ca^{2+} pump. Reconstitution of the purified enzymes into phospholipid vesicles"
Journal of Biological Chemistry 262, 5113-5117.
- Payan, P. (1978)
"A study of $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange across the gill of the perfused head of the trout (*Salmo gairdneri*)"
J. Comp. Physiol. 124, 181-188.
- Pequeux, A., Gilles, R. (1981)
" Na^+ fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*"
J. Exp. Biol. 92, 173-186.
- Pequeux, A., Chapelle, S., Wanson, S., Goffinet, G., François, C. (1983)
" $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase activity and phospholipid content of various fractions of posterior gills of *Corunus Maenos* and *Eriocheir sinensis*"
Mor. Biol. Lett. 4, 267-279.
- Pequeux, A., Marchal, A., Wanson, S., Gilles, R. (1984)
"Kinetic characteristics and specific activity of gill $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase in the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis* during salinity acclimation"
Mar. Biol. Lett., 5, 35-45.

- Pequeux, A., Gilles, R. and Marshall, W.S. (1988 a)
"Na Cl transport in gills and related structures"
Advances in Comparative and Environmental physiology Vol. 1 - Edited by R. Greger
- Powis, D.A. Anderson, T.A. Jackson, H. Wattus, G.C. (1983)
"Stimulation of neuronal (Na⁺ - K⁺)ATPase by calcium"
Biochem. Pharmacol. 32, 1219-1227.
- Powis, D.A. (1985)
"Failure of calcium to stimulate (Na-K)ATPase in the presence of EDTA"
Experientia 41 1048-1051.
- Pozzan, T., Gatti, G., Dozio, N., Vicentini, L.M. and Meldolesi, J. (1984)
"Ca²⁺ - dependent and - independent release of neurotransmitters from PC 12 cells : A role for protein kinase C activation ?"
J. Cell. Biol. 99, 628-638.
- Putney (Jr), J.W., McKinney, J.S., Aub, D.L. and Leslie, B.A. (1984)
"Phorbol ester - induced protein secretion in rat parotid gland. Relationship to the role of inositol lipid breakdown and protein kinase C activation in stimulus-secretion coupling"
Mol. Pharmacol. 26, 261-266.
- Rando, R.R. and Young, N. (1984)
"The stereospecific activation of protein kinase C"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 818-823.
- Rando, R.R. (1988)
"Regulation of protein kinase C activity by lipids"
FASEB J. 2, 2348-2355.
- Rasmussen, H., Forder, J., Kojima, I., Scriabine, A.
"TPA induced contraction of isolated rabbit vascular muscle"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 776-784.

Rozengurt, E., Rodriguez-Pena, A., Coombs, M. and Sinnett-Smith, J. (1984)
"Diacylglycerol stimulates DNA synthesis and cell division in mouse 3T3 cells : Role of Ca²⁺- sensitive phospholipid-dependent protein kinase"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5748-5752.

Sakamoto, C., Matozaki, T. ; Nagao, M. and Baba, S. (1985)
"Combined effect of phorbol ester and A23187 or dibutyryl cyclic AMP on pepsinogen secretion from isolated gastric glands"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 131, 314-319.

Sale, E.M., White, M.F., Kahn, R. (1987)
"Phosphorylation of glycolytic and gluconeogenesis enzymes by insulin receptor kinase"
J. Cell. Biochem. 33, 15-26.

Schlieper, C. (1929)
"Über die Einwirkung niederer Salzkonzentrationen auf marine Organismen"
Z. Vergl. Physiol. 9, 478-514.

Schoffeniels, E. and Gilles, R. (1970)
"Osmoregulation in aquatic arthropods"
in : M. Forkin and B. Scheer (eds) : Chemical Zoology, vol. 5. Academy Press, New York, London : 255-286.

Sekiguchi, K. , Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987)
"Three distinct forms of rat brain protein kinase C : Differential response to unsaturated fatty acids"
Biochem. Biophys. Res. Commun. 145, 797-802.

Shackelford, D.A. and Trowbridge, I.S. (1984)
"Induction of expression and phosphorylation of the human interleukin 2 receptor by phorbol diester"
J. Biol. Chem. 259, 11706-11712.

Schaw, J. (1960)
"The absorption of ions by the crayfish : The effect of external anion"
J. Exp. Biol. 37, 534-547.

Shenolikar, S. and Cohen, P. (1978)

"The substrate specificity of cyclic-AMP-dependent protein kinase : amino acid sequences at the phosphorylation sites of herring protamine (Clupeine)"

FEBS Lett. 86, 92-98.

Siffert, W. and Akkerman, J.W. (1988)

"Na⁺/H⁺exchange as a modulator of platelet activation"

T.I.B.S. 13, 148-151.

Spät, A., Fabiato, A., Rubin, R.P. (1986)

"Binding of inositol triphosphate by a liver microsomal fraction"

Biochem. J. 233, 929-932.

Sutherland, E.W. (1949)

"Activation of phosphoglucomutase by metal-binding agents"

J. Biol. Chem. 180, 1279-1283.

Sutherland, E.W. (1958)

"Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles"

J. Biol. Chem. 239, 1077-1071.

Takai, Y. ; Kishimoto, A. ; Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977/ I and II)

"Studies on a cyclic nucleotide independent protein kinase and its proenzyme in mammalian studies"

I. Purification and characterisation of an active enzyme from bovine brain.

II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain"

J. Biol. Chem. 252, 7603-7616.

Takai, Y., Kikkawa, U., Kaibuchi, K., Nishizuka, Y. (1984)

"Membrane phospholipid metabolism and signal transduction for protein phosphorylation"

Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 18, 119-158.

- Towle, D.W. ; Palmer, G.E., Harris, J.L. (1976)
"Role of gill (Na⁺- K⁺) - dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity"
J. Exp. Zool. 196, 315-322.
- Uchida, T. and Filburn, C.R. (1984)
"Affinity chromatography of protein kinase C - Phorbol ester receptor on polyacrylamide-immobilised phosphatidyl serine"
J. Biol. Chem. 259, 12311-123114.
- Walsh, D.T., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968)
"An adenosine 3', 5' - monophosphate - dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle"
J. Biol. Chem. 243, 3763-3765.
- Wanson, S., Pequeux, A., Leray, C. (1983)
"Effect of salinity changes on adenylate energy charge in gills of two euryhaline crabs"
Arch. Int. Physiol. Biochem. 91, 81-82.
- Weinman, E.J. and Shenolikar, S. (1986)
"Protein kinase C activates the renal apical membrane Na⁺/H⁺ exchanger"
J. Membrane Biol. 93, 133-139.
- Yamamoto, K., Chadarevian, A. and Pellegrini, M. (1988)
"Juvenile Hormone action mediated in male accessory glands of drosophila by calcium and kinase C"
Science (Whash DC) 239, 916-919.
- Yingst, D.R. (1988)
"Modulation of the (Na, K)-ATPase by Ca and intracellular proteins"
Ann. Rev. Physiol. 50, 291-303.
- Zatz, M. (1985)
"Phorbol esters mimic α -adrenergic potentiation of serotonin N-acetyl-transferase induction in the rat pineal".
J. Neurochem., 45, 637-639.

Zawalich, W., Brown, C. and Rasmussen, H. (1983)

"Insulin secretion : Combined effect of phorbol ester and A23187"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 448-455.