



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Détermination du taux du fru-2,6-bP et modulation de la concentration de cet ester phosphorique dans les branchies du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce H. Milne-Edwards

Mellouki, Didier

*Award date:*  
1990

*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 Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Tél. 081/72.41.11 - Téléx 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

**DETERMINATION DU TAUX DE FRU-2,6-bP ET MODULATION  
DE LA CONCENTRATION DE CET ESTER PHOSPHORIQUE DANS  
LES BRANCHIES DU CRABE ERIOCHEIR SINENSIS  
ACCLIMATE À L'EAU DOUCE H. MILNE-EDWARDS.**

MELLOUKI DIDIER

Résumé

Le fru-2,6-bP, en activant la PFK-1, accélère la glycolyse et l'apport énergétique nécessaire au travail des pompes ioniques intervenant dans l'osmorégulation du crabe euryhialin *Eriocheir sinensis*.

Les concentrations en fru-2,6-bP ont été mesurées dans les branchies antérieures et postérieures de ce crabe adapté à l'eau douce. Celles-ci sont significativement plus importantes dans les branchies postérieures. La perfusion de branchies postérieures en présence de DB AMPc ou d'O.A.G. entraîne une augmentation significative du taux de fru-2,6-bP.

En conclusion, nos résultats montrent que l'augmentation du taux de fru-2,6-bP est effectivement le signe d'une consommation énergétique plus importante, cela en relation avec une activité plus intense des pompes ioniques (ce qui apparaît davantage dans les branchies postérieures). Ils indiquent que les modulations de sa concentration peuvent résulter de la phosphorylation de protéines.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1990

Promoteur : Professeur P. Devos

*Au terme de cette année, je tiens à remercier tout particulièrement le Révérend Père P. DEVOS, promoteur de ce mémoire, pour l'immense disponibilité dont il a fait preuve durant tout l'année.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Marie-Ange BENOIT pour les conseils et la patience qu'elle m'a témoignés tout au long de cette année.*

*Je tiens également à remercier Suzanne LORET et Vincent ASSELBOURG pour l'aide qu'ils m'ont apportée pour la réalisation de ce travail.*

*Je remercie les personnes du Département d'Endocrinologie qui, à tout moment, m'ont aidé et conseillé.*

*Je n'oublierai pas mes parents qui m'ont apporté leurs encouragements tout au long de ces études et sans qui rien n'eût été possible.*

# **TABLE DES MATIERES**



**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....1**

**PRELIMINAIRE. ORIGINE DE LA GLYCOLYSE.....1**

**CHAPITRE I. LA GLYCOLYSE.....2**

- 1. LA GLYCOLYSE CHEZ LES MAMMIFERES.....2
- 2. LA GLYCOLYSE CHEZ LES INVERTEBRES.....3
  - a. En général.....3
  - b. Chez les crustacés.....3
- 3. SITES DE CONTROLE DE LA GLYCOLYSE.....4

**CHAPITRE II. LE FRUCTOSE -2,6-BP.....6**

- A. DECOUVERTE.....6
  - 1. Expériences ayant permis de l'identifier.....6
  - 2. Régulation du cycle F-6P/F-1,6-bP chez *S. cerevisiae*.....7
- B. SYNTHÈSE ET DEGRADATION DU FRU-2,6-bP.....8
  - 1. Contrôle de la concentration en fru-2,6-bP dans le foie et dans le muscle.....8
  - 2. PFK-2 et PFPase-2 : enzyme bifonctionnel.....9
  - 3. Caractéristiques de la PFK-2/F-2,6 bisphosphatase.....9
    - a. Description.....9
    - b. Affinité pour les substrats et régulation.....10
  - 4. La PFK-2 et la FBPase-2 : séparables chez la levure.....10
  - 5. La PFK-2/FBPase-2 et contrôle de la glycolyse.....11
- C. CONTROLE DE L'ACTIVITE DE CERTAINS ENZYMES PAR LE FRUCTOSE-2,6-bP.....11
  - I. Caractérisation de la PFK-1 dépendant de l'ATP.....11
    - 1. La PFK-1 à travers le monde du vivant.....12
    - 2. Modes de régulation de cette PFK-1.....14
  - II. Caractérisation de la PFK-1 dépendante du pyrophosphate.....14
  - III. Pyruvate kinase.....15
  - IV. Fructose-1,6-bisphosphatase.....15
  - V. Autres enzymes.....17

**CHAPITRE III. ROLE DU FRU-2,6-bP DANS LA REGULATION METABOLIQUE.....18**

- I. DANS LE FOIE DE RAT.....18
- II. DANS D'AUTRES TISSUS.....20
  - 1. Les muscles striés.....20
  - 2. Le tissu adipeux.....20
- III. DANS LA LEVURE.....21



IV. DANS LES SPORES DE CHAMPIGNONS .....	22
V. CHEZ LES PLANTES .....	22
VI. CONCLUSION : LE FRU-2,6-bP, SIGNAL GLYCOLYTIQUE .....	23

<b>CHAPITRE IV. LA BRANCHIE : ORGANE OSMOREGULATEUR ET LIEU DE REGULATION IONIQUE .....</b>	<b>25</b>
A. INTRODUCTION .....	25
B. ORGANES INCLUS DANS L'OSMOREGULATION .....	26
a) Aspects structuraux .....	26
b) Les aspects physiologiques .....	27
C. ROLE DES FACTEURS HORMONAUX ET DES BIOAMINES SUR LA BRANCHIE .....	27
1. Les facteurs hormonaux .....	28
2. Les bioamines.....	28

<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>29</b>
-----------------------------------	-----------

<b>CHAPITRE I. MATERIEL BIOLOGIQUE .....</b>	<b>29</b>
1. INTERET DES RECHERCHES SUR LES CRUSTACÉS .....	29
2. DESCRIPTION DE L'ANIMAL ET POSITION SYSTÉMATIQUE.....	29
3. STABULATION DES ANIMAUX.....	30

<b>CHAPITRE II. PROCEDURES PREPARATIVES.....</b>	<b>31</b>
1. PRELEVEMENT DES ORGANES.....	31
2. TRAITEMENT DU TISSU BRANCHIAL.....	31
3. TECHNIQUE DE PERFUSION DES BRANCHIES.....	32
a. Principe.....	32
b. Composition de la solution isotonique (RINGER "eau douce").....	32
c. Mode opératoire .....	32
d. Mesure de la différence de potentiel.....	32

<b>CHAPITRE III. DOSAGE DU FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATE .....</b>	<b>34</b>
1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE.....	34
2. REACTIFS ET SOLUTIONS .....	35
3. MODE OPERATOIRE.....	35
4. COURBE ÉTALON ET COURBE DES DILUTIONS .....	36

<b>CHAPITRE IV. ORIENTATION DU TRAVAIL .....</b>	<b>37</b>
--	-----------

<b>RESULTATS.....</b>	<b>39</b>
<b>CHAPITRE I. CONDITIONS DE DOSAGE DU FRU-2,6-bP.....</b>	<b>39</b>
1. DROITE D'ÉTALONNAGE.....	39
2. VÉRIFICATIONS CONCERNANT LA VALIDITÉ DU TEST.....	39
2.1. Dosage d'un extrait branchial sans fru-6P.....	39
2.2. Contrôle avec et sans PPI.....	40
2.3. Stabilité du signal.....	40
<b>CHAPITRE II. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LES DEUX TYPES DE BRANCHE D'ERIOCHEIR SINENSIS ACCLIMATE A L'EAU DOUCE.....</b>	<b>42</b>
1. EFFET DU TRAITEMENT DU TISSU .....	42
2. MESURE DU TAUX DE FRU-2,6-bP DANS LES BRANCHIES ANTERIEURES.....	43
3. MESURE DU TAUX DE FRU-2,6-bP DANS LES BRANCHIES POSTERIEURES .....	44
4. COMPARAISON DES CONCENTRATIONS OBTENUES DANS LES BRANCHIES ANTERIEURES ET LES BRANCHIES POSTERIEURES.....	45
<b>CHAPITRE III. CONTROLE HORMONAL DE LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LES BRANCHIES POSTERIEURES D'ERIOCHEIR SINENSIS ACCLIMATE A L'EAU DOUCE.....</b>	<b>47</b>
1. EFFET DE LA PERFUSION SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LA BRANCHE POSTERIEURE.....	47
2. EFFET DE LA PERFUSION AVEC DU DIBUTIRYL AMPc (150 µM).....	49
2.1. Pourquoi du dibutyril AMPc.....	49
2.2. Pourquoi perfuser avec du AMPc.....	49
2.3. Effet du DB AMPc sur la concentration en fru-2,6-bP .....	50
3. EFFET DE LA PERFUSION A L'OAG.....	51
<b>CHAPITRE IV. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>53</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADP	adénosine-5'-bisphosphate
ALD	aldolase
5'AMP	adénosine-3',5'-monophosphate
AMP	adénosine-5'-monophosphate
ATP	adénosine-5'-triphosphate
DAP	déshydroxy acétone phosphate
Fru-2,6-bP	fructose-2,6-bisphosphate
F-6-P	fructose-6-phosphate
FBPase-1	fructose-1,6-bisphosphatase
FBPase-2	fructose-2,6-bisphosphatase
GAD	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
G-6P	glucose-6 phosphate
GDH	glycérol-3 phosphate déshydrogénase
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dénucléotide forme oxydée
NADH	nicotinamide adénine dénucléotide forme réduite
OAG	oléildiacyl glycérol
PFK	phosphofructokinase de pomme de terre
PFK-1	phosphofructokinase 1
PFK-2	phosphofructokinase 2
PPi-PFK	phosphofructokinase dépendant du pyrophosphate
PM	poids moléculaire
SAB	albumine sérique bovine
SDS	sodium dodécyl sulfate



**REVUE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## PRELIMINAIRE : ORIGINE DE LA GLYCOLYSE

Il y a environ 3 milliards d'années dans la soupe prébiotique et sous une atmosphère primitive, apparaissent les premiers unicellulaires vivants. Pour vivre et se multiplier, ils avaient besoin d'énergie aisément accessible dans le milieu environnant. Puis, ces types d'énergie se raréfiant, ils ont dû, pour survivre, être capable de les extraire en catabolisant cette fois des métabolites plus complexes qui se trouvaient dans leur milieu. Cela impliquait différentes étapes enzymatiques qui se regroupent dans ce qu'on appelle une voie métabolique. Seuls les organismes possédant les potentialités génétiques capables de générer ces voies métaboliques ont pu survivre, les autres ont tout simplement disparus.

La fermentation anaérobie est le premier mécanisme apparu. Telle que nous la connaissons actuellement, elle se présente comme suit. Sa première partie est la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof, fournissant l'énergie dont ces organismes ont besoin sous forme d'ATP. Cette voie dégradative part du glucose ou de ses dérivés pour aboutir au pyruvate. La deuxième partie de la fermentation part du pyruvate pour donner des produits finaux comme le lactate, l'éthanol, ..., celui-ci caractérisant le type de fermentation : on parlera donc de fermentation lactique, alcoolique, etc... Ces produits finaux, pourtant source d'énergie, sont des déchets pour ces organismes. La fermentation proprement dite n'étant intéressante que par le fait de régénérer du  $\text{NAD}^+$  toujours présent en petites quantités dans la cellule à partir de  $\text{NADH}$ . Ce  $\text{NAD}^+$  est utilisé dans la glycolyse pour la formation de deux précieux ATP qui représentent une quantité très faible d'énergie comparée aux 34 ATP supplémentaires que rapportera la respiration beaucoup plus tard. Néanmoins, si ces organismes primitifs n'avaient pu inventer ce processus catabolique, ils n'auraient jamais pu donner naissance aux formes plus évoluées dont nous faisons partie et qui utiliseront la respiration.



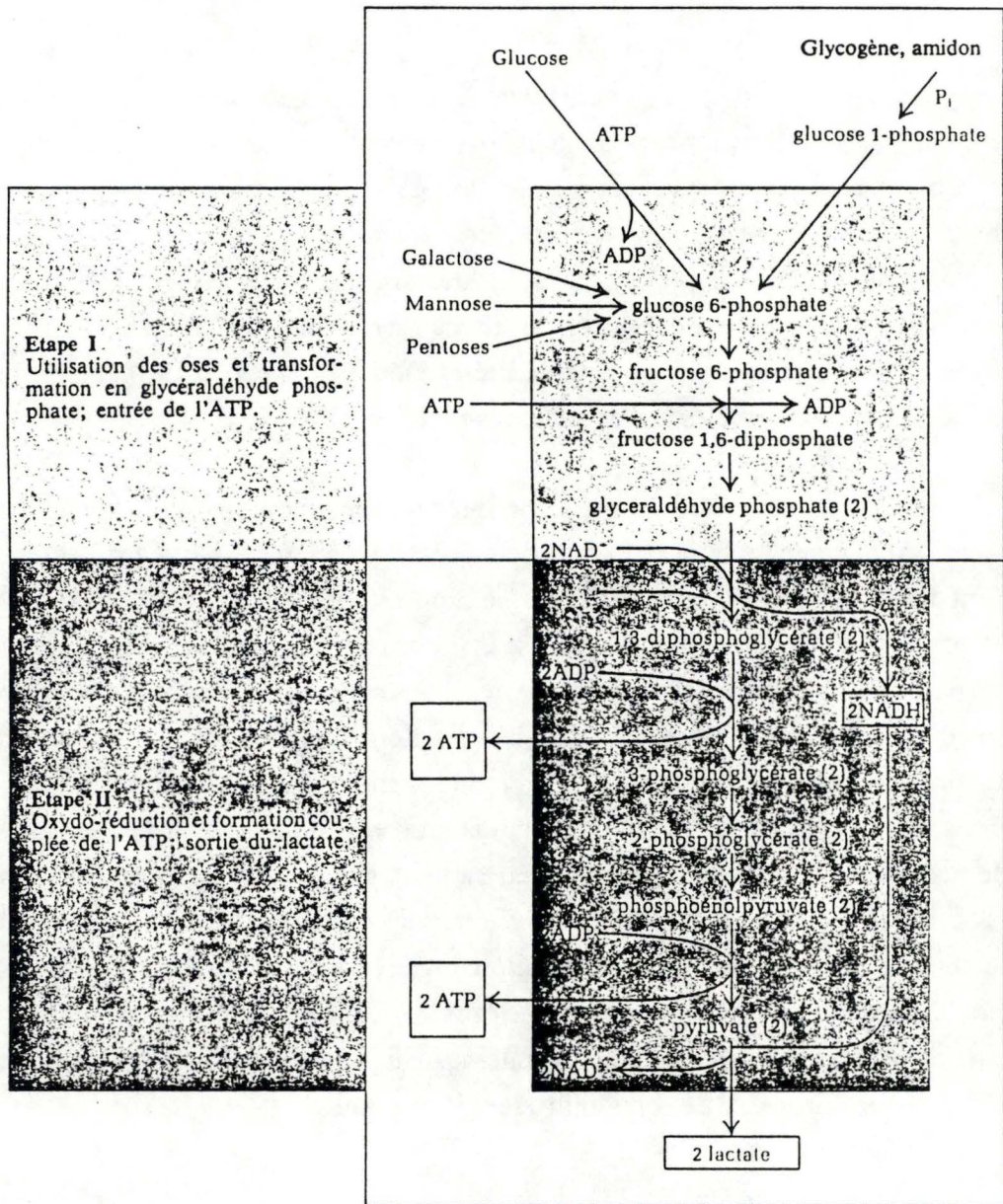


Fig.1 Les deux étapes de la glycolyse. [1]



## CHAPITRE I. LA GLYCOLYSE

Nous distinguerons la glycolyse chez les mammifères de la glycolyse chez les invertébrés et plus spécialement de celle observée chez les crustacés.

### 1. LA GLYCOLYSE CHEZ LES MAMMIFERES

Elle a un double rôle : d'une part elle dégrade le glucose ou ses dérivés pour donner de l'ATP et, d'autre part, elle fournit le squelette carboné qui servira à la formation des différents composants cellulaires. Chez les organismes plus évolués ayant besoin de beaucoup plus d'énergie, la respiration vient se greffer à la glycolyse.

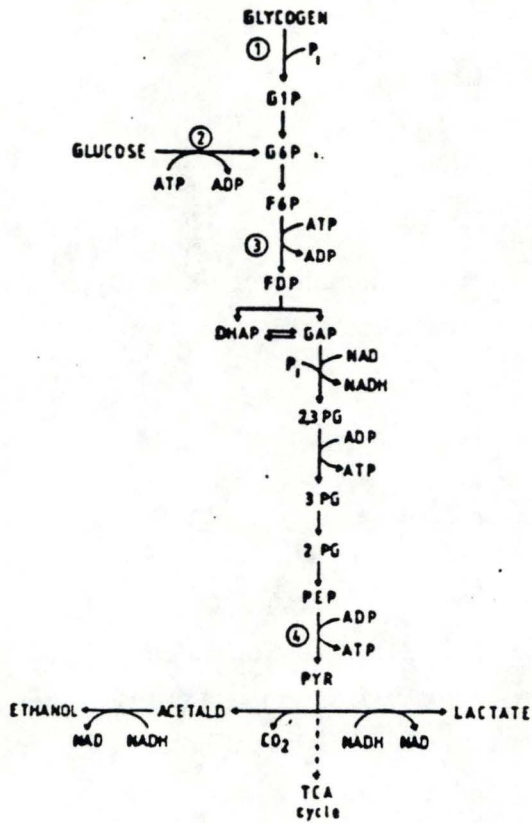
Les étapes de la glycolyse sont catalysées par l'action séquentielle de 10 enzymes. Ceux-ci peuvent être extraits de la portion soluble du cytoplasme bien que des associations à différents éléments tels que les mitochondries ou le cytosquelette soient possibles. Le glucose est d'abord phosphorylé et scindé en deux pour donner un sucre à trois carbones, le glycéraldéhyde-3-P qui, par la suite, sera transformé en acide lactique.

La première partie de la glycolyse est préparatoire, un certain nombre d'hexose P comme le glucose P, le galactose P et le mannose P (provenant du cycle des pentoses P) y convergent. Ils sont finalement transformés en un produit commun, le glycéraldéhyde-3-P.

Sa seconde partie est caractérisée par plusieurs étapes d'oxydo-réduction et par le mécanisme qui récupère de l'énergie sous forme d'ATP et produit du 3-phosphoglycérate s'isomérisant en du 2-phosphoglycérate. Après déshydratation par l'énolase, le phosphoénolpyruvate formé cède son groupe phosphate riche en énergie à de l'ADP, ce qui provoque la transformation de ce phosphoénolpyruvate en pyruvate libre [1] (figure 1). Le pyruvate, en libérant  $2H^+$  et un  $CO_2$ , donne de l'acétyl Co A qui entre dans le cycle de Krebs.



**A. ANAEROBIC GLYCOLYSIS**



**B. GLYCOLYSIS WITH ALTERNATIVE END PRODUCTS**

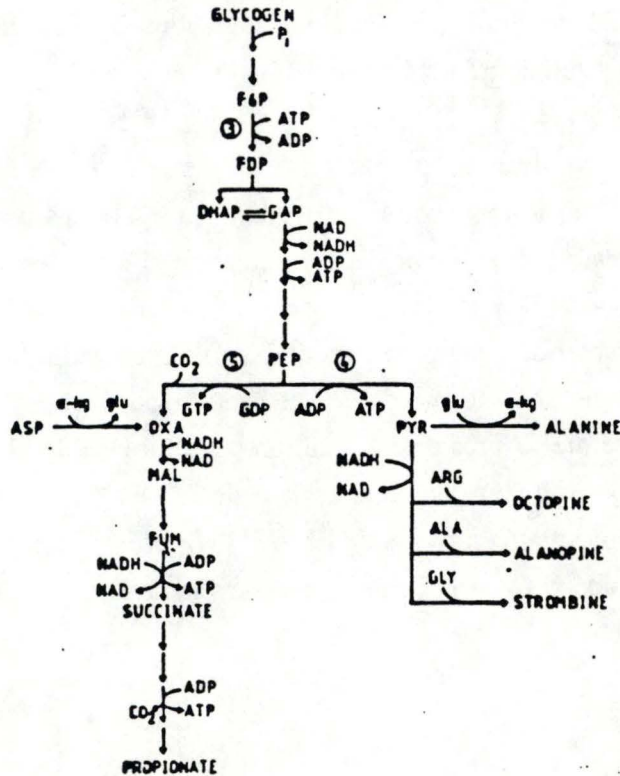


Fig 2 et 3 : La glycolyse chez les invertébrés : formation de métabolites particuliers [9]

## 2. LA GLYCOLYSE CHEZ LES INVERTEBRES

### A. EN GENERAL

Les voies métaboliques du catabolisme des hydrates de carbone sont semblables à celles décrites chez les mammifères. Cependant, un grand nombre d'organismes, en condition d'apoxie, ont mis au point des systèmes particuliers permettant de régénérer du NAD<sup>+</sup>. Ainsi chez de nombreux microorganismes, il y a synthèse de lactate ou d'éthanol à partir de pyruvate. Ce processus est appelé fermentation (figure 2). D'autre part, la glycolyse peut aboutir à la formation d'autres métabolites comme le succinate, l'alanine et trois autres produits provenant de la condensation du pyruvate avec des acides aminés (glycine, alanine, arginine) pour former la strombine, l'alanopine et l'octopine appelées les opines [2] (figure 3). Ainsi, chez l'huître *Crassostrea virginica* et chez les mollusques bivalves *Vénus gallina* et *Scapharca inequivalis*, les produits terminaux de la glycolyse anaérobie sont le succinate et la L-alanine. Chez les helminthes parasites comme l'*Ascaris lumbricoïdes*, il y a accumulation de succinate qui est directement proportionnelle au travail musculaire [3,4].

### B. CHEZ LES CRUSTACES

Le fonctionnement de la glycolyse est maintenant bien connu chez les crustacés. Un grand nombre de travaux ont été réalisés sur les enzymes glycolytiques. Il ressort de ceux-ci que tous les enzymes présents chez les vertébrés se retrouvent chez les crustacés et que leurs mécanismes régulateurs sont similaires [5]. Néanmoins, il existe certaines particularités propres aux crustacés qui dépendent du cycle de mue et correspondent, de manière générale, à l'adaptation métabolique à certaines conditions environnementales. Nous en présentons quelques exemples.

Pendant l'intermue de l'écrevisse *Pacifastacus leniciserilus*, la glycolyse est considérée comme la voie prédominante du catabolisme des hydrates de carbone [6]. D'autre part, chez l'écrevisse *Orconectes virilis* et chez le crabe *Paratelphusa hydrodromus*, c'est le cycle des pentoses-P qui prédomine pendant cette période, la glycolyse étant plus importante pendant la mue et surtout la prémue [7,8,9].

En hypoxie, chez les crustacés et insectes, la dégradation des phosphagènes comme la créatine P et la glycolyse anaérobie aboutissant à l'acide lactique, sont les principales sources d'énergie. L'existence de la voie succinate-propionate n'y a pas été mise en évidence [10].



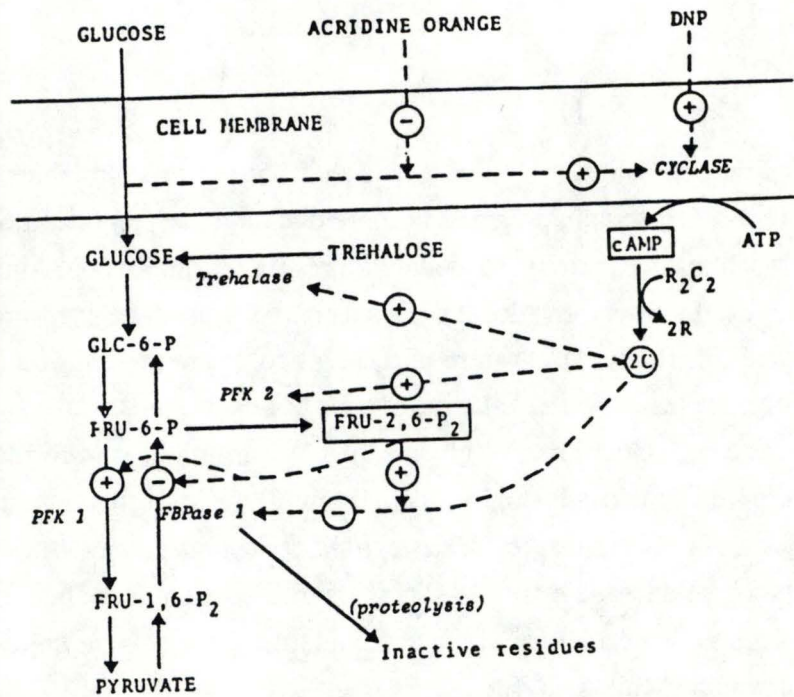


Fig 7 . Control of glycolysis and gluconeogenesis by cyclic AMP and Fru-2,6-P<sub>2</sub> in *S. cerevisiae*. Abbreviations: DNP = dinitrophenol (modified from François et al., 1984) [22].

La glycolyse a également été étudiée chez le homard *Homarus vulgaris* principalement au niveau du muscle de l'abdomen et de celui de la pince. Son fonctionnement dépend de la disponibilité en oxygène. En aérobose, le métabolisme du muscle de la pince est plus oxydatif que celui du muscle abdominal. En anaérobose, le muscle abdominal accumule une grande quantité de L-lactate tandis que celui de la pince produit de la L-alanine [11].

Dans les branchies du crabe *Carcinus maenas*, le glucose est métabolisé en grande partie en alanine, sucres phosphates et acide lactique avec très peu d'incorporation dans les intermédiaires du cycle de l'acide citrique [12].

En résumé, lorsqu'un organisme est en pleine activité, la quantité d'oxygène fournie via le liquide sanguin peut être insuffisante pour satisfaire la demande de tous les tissus car il y a saturation des transporteurs d'oxygène. Face à ce problème, les animaux ont recours à des modifications du débit sanguin qui assure un apport accru d'hydrates de carbone vers les tissus qui en ont besoin comme les muscles. Ceci leur permet de réaliser un travail musculaire soutenu en utilisant la glycolyse anaérobie. L'apport énergétique assuré par cette dernière permet la survie des organismes, vertébrés ou autres, dans les milieux anoxiques mais cela suppose bien évidemment des mécanismes de régulation très élaborés que nous allons considérer dans ce qui suit [2].

### 3. SITES DE CONTROLE DE LA GLYCOLYSE

La glycolyse se déroule en sens inverse de la gluconéogenèse mais il n'y a que trois enzymes différents entre ces deux voies, ceux qui catalysent les réactions irréversibles s'accompagnant d'une importante diminution de  $\Delta G'$ .

Ainsi, les analyses effectuées sur l'érythrocyte humain ont permis de déterminer la concentration à l'équilibre de tous les intermédiaires de la glycolyse (tableau 1) sachant que le globule rouge tire toute son énergie de la glycolyse. A partir de ces valeurs, il est aisé de calculer pour l'érythrocyte normal la variation d'énergie libre ( $\Delta G'$ ) de chaque réaction de type  $A + B$  (réactifs)  $\rightarrow C + D$  (produits), en appliquant l'équation :

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$



**Tableau 1.** Les concentrations à l'état stationnaire des intermédiaires de la glycolyse dans l'érythrocyte humain [1]

<i>Intermédiaire</i>	<i>Concentration (<math>\mu</math>M)</i>
Glucose	5000
Glucose-6-phosphate (G6P)	83
Fructose-6-phosphate (F6P)	14
Fructose-1,6-diphosphate (FDP)	31
Dihydroxyacétone phosphate (DHP)	138
Glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP)	18,5
3-Phosphoglycérate (3PG)	118
2-Phosphoglycérate (2PG)	29,5
Phosphoénolpyruvate (PEP)	23
Pyruvate (Pyr)	51
Lactate (Lact)	2900
ATP	1850
ADP	138
Phosphate	1000

dans laquelle :  $\Delta G'$  = variation d'énergie libre

[A], [B], [C], [D] sont les concentrations molaires de A, B, C, D et a, b, c, d sont les exposants de leur concentration

R est la constante des gaz parfaits ( $1,987 \text{ cal mole}^{-1} \text{ degré}^{-1}$ )

T est la température absolue

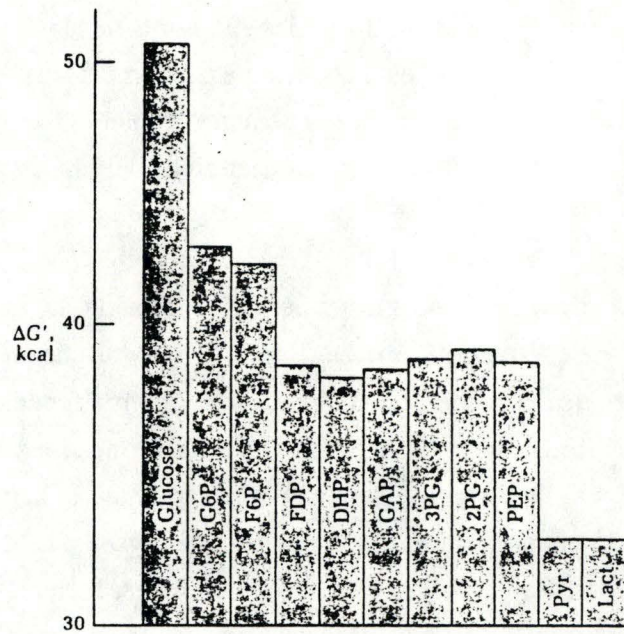
$\Delta G^{\circ}$  est la variation d'énergie libre standard

A partir de valeurs obtenues de cette façon, le profil d'énergie libre de la glycolyse de l'érythrocyte est tracé (figure 4). Il montre que huit des réactions de la glycolyse sont dans un état proche de l'équilibre, alors que trois réactions s'accompagnent d'une diminution importante d'énergie libre (et de ce fait sont loin des conditions d'équilibre) : ce sont les réactions catalysées par l'hexokinase, la phosphofruktokinase et la pyruvate kinase. De plus, il paraît maintenant certain que la réaction catalysée par la phosphofruktokinase est la réaction limitante dans la glycolyse [1]. Comme elle est fortement activée par le fructose-2,6-bP, on peut comprendre le rôle capital joué par cet ester phosphorique dans la glycolyse. Celui-ci constitue l'objet du chapitre suivant.



Fig 4

Profil énergétique de la glycolyse dans l'érythrocyte humain. Toutes les réactions sont proches de l'équilibre ou à l'équilibre, sauf celles catalysées par l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase, qui s'accompagnent d'une importante diminution de  $\Delta G'$ . Les abréviations utilisées sont définies dans le tableau 15-1 [A].



## CHAPITRE II. LE FRUCTOSE -2,6-bP

Le fructose -2,6-bP est un activateur puissant de la PFK du foie, des muscles et de glandes comme les glandes salivaires. On le retrouve chez beaucoup d'animaux, de plantes et dans les champignons. Il joue un rôle régulateur sur d'autres enzymes dont les principaux sont la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase-1), la pyruvate kinase et une PFK caractéristiques des plantes qui, elle, dépend du pyrophosphate (PPi-PFK) (figure 6).

### A. DECOUVERTE

Il y a une quinzaine d'années, le mécanisme de régulation de la PFK par le fructose-2,6-bP n'était pas connu. On pensait alors que son activité était régulée par deux substrats l'ATP, le fructose-6P ainsi que par une large série d'effecteurs négatifs (le citrate et l'ion  $H^+$ ) ou positifs (le fructose -1,6-bP, le 5'AMP, l'ion  $NH_4^+$ ,  $HPO_4^{=}$ ). Puis, il y a une dizaine d'années de cela, Van Schaftingen découvrait un stimulateur de la PFK du foie et des muscles, stimulateur de faible poids moléculaire qui s'avérait être le fructose-2,6-bP. Cet ester phosphorique exerce son action en augmentant l'activité des PFK du foie et des muscles, en supprimant leur inhibition par l'ATP et en augmentant leur affinité pour le fructose-6P [13].

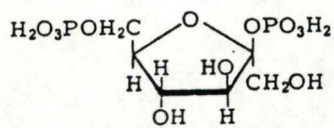
#### 1. EXPERIENCES AYANT PERMIS DE L'IDENTIFIER

La filtration sur tamis moléculaire d'un extrait de foie de rat non traité au glucagon entraîne une diminution de l'affinité pour le fructose-6P de la PFK contenue dans la fraction des hauts PM. Par contre, la PFK d'une même fraction obtenue à partir d'un animal traité au glucagon demeure active. De plus, dans le cas de l'animal non traité au glucagon, quand on recombine à la fraction des hauts poids moléculaires (PM) une fraction contenant les molécules de petit poids moléculaire, on retrouve l'activité de l'extrait non filtré. Cela voudrait dire qu'il existerait un activateur de la PFK de petit poids moléculaire.



Fig 6 . **D-Fructose 2,6-Bisphosphate**

$\beta$ -D-Fructofuranoside 2,6-bisphosphate[14].



Cet activateur possède les propriétés suivantes :

- Il est détruit par la phosphatase alcaline; après filtration sur gel, il est retenu de la même manière que le fructose-1,6-bP.
- Au contraire des nucléotides, il n'est pas retenu sur le charbon actif.
- Il est précipité sous forme de sel de barium en absence d'éthanol.
- Il migre avec le fructose -1,6-bP sur une colonne échangeuse d'anions.
- Il n'est pas détruit par la fructose-1,6-biphosphatase. De plus, au contraire du fructose-1,6-bP, il est très vite détruit en milieu acide même à basse température. C'est peut-être à cause de son acido-labilité que l'on ne l'a pas découvert plus tôt. Cette dernière caractéristique est à la base de la détermination de l'activateur car, quand on l'incube à 0°C avec du HCl 0,01M, il est rapidement dégradé et on obtient une quantité équimolaire de fructose-6P et de Pi [14].

Le fructose-2,6-bP ou plus exactement le B-D-Fructofuranoside-2,6-bP est un isomère du fructose-1,6-bP. Cependant, il n'est pas un intermédiaire de la glycolyse tout en étant un puissant régulateur de cette voie. Il a été détecté à des concentrations comprises entre  $10^{-10}$  et  $10^{-8}$  mole/g de tissu dans des organismes dispersés à travers tout le monde vivant [14]. Il intervient dans la régulation de la glycolyse et donc de la gluconéogenèse en agissant à travers la PFK-1 sur le cycle F-6P/F-1,6-bP, ce dont nous allons traiter dans le paragraphe suivant.

## 2. REGULATION DU CYCLE F-6P/F-1,6-BP CHEZ S. CEREVISIAE

Le passage du F-6P au fructose-1,6-bP catalysé par la PFK-1 est un site de régulation important de la glycolyse. Le rôle du fructose-2,6-bP est de stimuler fortement cette PFK-1, en tout cas dans le foie et les muscles de mammifère, et donc d'y activer la glycolyse.

Une autre enzyme intervient dans la régulation de ce cycle, c'est la fructose -1,6-biphosphatase (FBPase-1) qui transforme le fructose -1,6-bP en fructose -6P. Ici aussi le fructose -2,6-bP joue un rôle en rendant moins active cette FBPase-1 et donc il inhibe la gluconéogenèse (figure 7).

Plusieurs méthodes ont été proposées pour mesurer ce cycle, dont la formation de  $^3\text{H}_2\text{O}$  à partir de glucose ayant en position 3 ou 5 un hydrogène radioactif [61, 64]. La dégradation du fructose-1,6-bP en fructose -6P s'accompagne en effet de la libération d'un groupement phosphate et d'une molécule d'eau qui sera radioactive si le glucose de départ l'était.



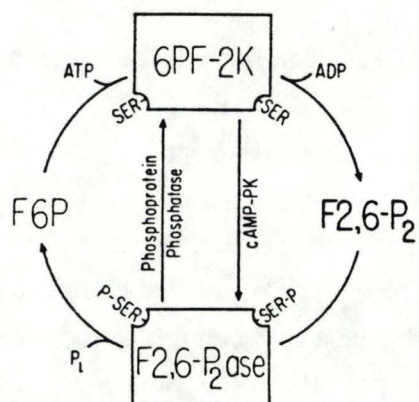


Fig 8 - Scheme for the regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by phosphorylation/dephosphorylation [12].

Cette étude réalisée chez *S. cerevisiae*, ainsi que d'autres réalisées sur des hépatocytes isolés [62], ont montré que le glucagon diminue le flux glycolytique via l'inhibition de la PFK-1. En théorie, l'effet négatif de l'hormone pourrait être dû à un changement dans la concentration d'un effecteur positif ou négatif ou encore dans une modification covalente de l'enzyme. Cependant, le fructose-6-P et le 5'AMP, deux effecteurs positifs de la PFK, ont été trouvés en concentration plus importante alors que la concentration de l'ATP, un inhibiteur, diminuait. Ces changements pouvaient seulement augmenter l'activité de la PFK-1. Par ailleurs, le fructose-1,6-bP, un autre effecteur positif de l'enzyme, connu pour avoir une concentration moindre suite à un traitement au glucagon, pouvait simplement représenter une conséquence du changement du flux à travers la PFK-1 plutôt que sa cause.

Une modification covalente de la PFK-1 fut sérieusement considérée quand plusieurs groupes de chercheurs montrèrent que l'activité de la PFK-1 était réduite dans des extraits de foie exposés au glucagon. Le changement des propriétés cinétiques consistant en une diminution de l'affinité pour le fructose-6-P et une augmentation de l'inhibition par l'ATP. On pensait que cela résultait d'une modification covalente de la PFK-1, surtout sur les bases suivantes :

- (1) la précipitation au sulfate d'ammonium, la filtration sur gel ou même la purification de l'enzyme n'abolissaient pas la modification des cinétiques;
- (2) de plus, des expérimentations *in vivo* indiquaient que le glucagon induisait une augmentation de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  à partir de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  dans l'enzyme [14, 63, 64].

## **B. SYNTHÈSE ET DÉGRADATION DU FRU-2,6-bP**

### **1. CONTRÔLE DE LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LE FOIE ET DANS LE MUSCLE**

La concentration du fru-2,6-bP est contrôlée par l'activité relative de la phosphofructokinase-2 (PFK-2) et de la fructose-2,6-biphosphatase (FBPase-2). Dans le foie, un moyen majeur de contrôle semble être la phosphorylation de la PFK-2/FBPase-2 par la protéine kinase dépendant de l'AMPc, phosphorylation qui entraîne l'activation de la FBPase-2 et l'inhibition de la PFK-2, ce qui provoque une diminution du taux de fru-2,6-bP. Par ce mécanisme, la glycolyse et la gluconéogenèse sont sous le contrôle de l'AMPc et donc d'hormones agissant sur l'adénylate cyclase. Dans le foie de poulet, il semblerait que cela soit le seul moyen par lequel la glycolyse et la gluconéogenèse sont contrôlées puisque la pyruvate kinase de foie n'est pas activée par phosphorylation chez ces espèces. Par contre, dans le muscle, l'absence de phosphorylation de PFK-2/FBPase-2 par une protéine kinase dépendant



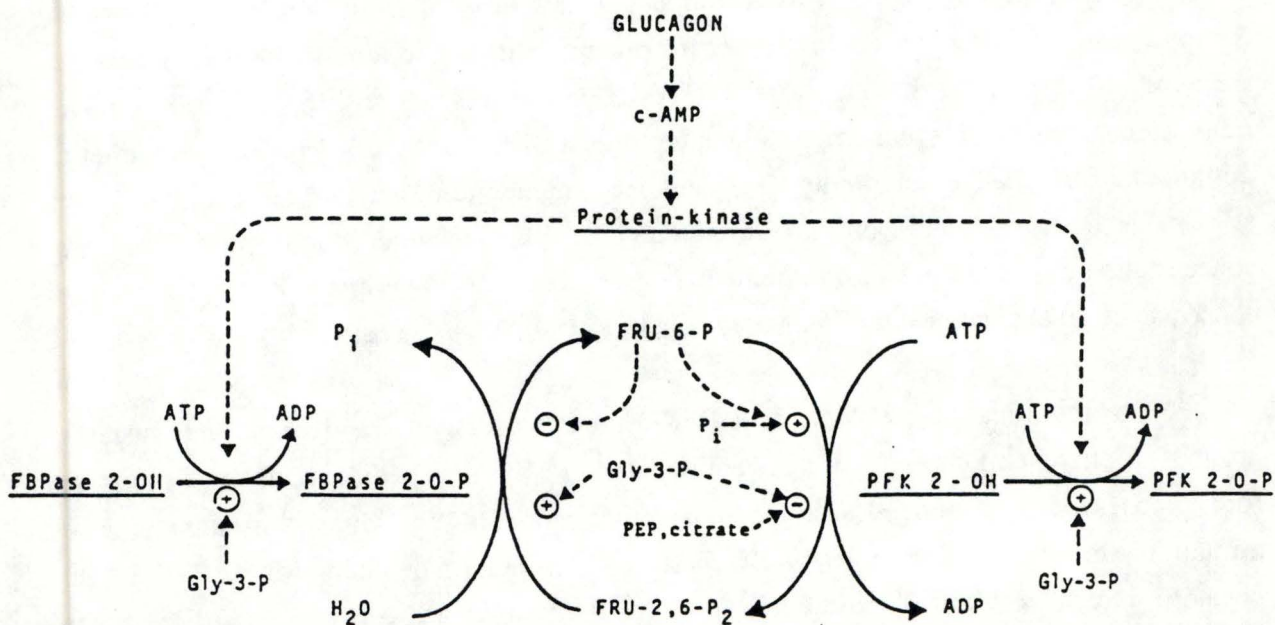


Fig 9. Biosynthesis and biodegradation of Fru-2,6-P<sub>2</sub> in the liver and their control by glucagon and metabolites. Not shown on the scheme is the fact that PFK 2 and FBPase 2 are part of a single bifunctional enzyme. Abbreviations: PEP = P-enolpyruvate; Gly-3-P = glycerol 3-phosphate (modified from Hers and Van Schaftingen, 1982)[22].

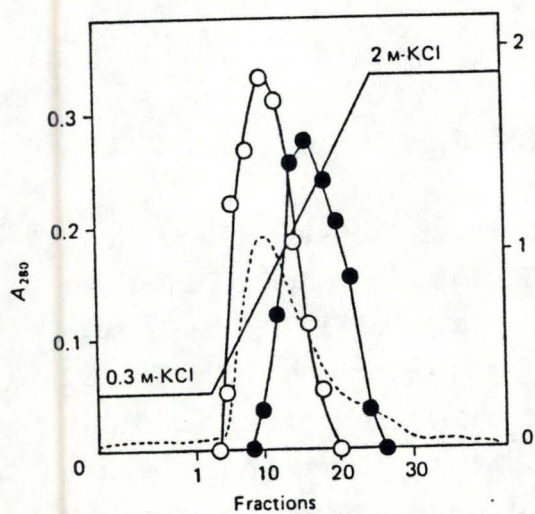


Fig 10. Elution of FBPase-2 (○) and PFK-2 (●) from Sephacryl Blue S-300 [23].



de l'AMPc semble signifier que le fru-2,6-bP échappe au contrôle direct via l'AMPc. La PFK-2 et la FBPase-2 peuvent cependant être modulées par des métabolites de la même façon que dans le foie; ainsi, le citrate, le phosphoénolpyruvate et le glycérol-3P sont connus pour réaliser l'effet inverse de l'AMP cyclique. Ceci pourrait être la base d'un contrôle négatif de la glycolyse par le citrate, phosphoénolpyruvate et glycérol-3P [15] (figures 8 et 9).

## 2. PFK-2 ET FBPASE-2 : ENZYME BIFONCTIONNEL

La PFK-2/FBPase-2 est une même molécule formée de deux domaines catalytiques indépendants. On a la preuve maintenant que la kinase et la phosphatase sont la moitié d'un enzyme bifonctionnel, respectivement, de structure similaire à la PFK-1 de la glycolyse et à la phosphoglycérate mutase.

En comparant les configurations spéciales de ces protéines, on a pu montrer que le domaine C-terminal de la phosphatase qui est une zone hydrophobique et qui possède un site actif, équivaut à la structure des mutases de levure. La séquence modèle obtenue par l'alignement structural des mutases et des biphosphatases montre une similarité significative avec la famille des phosphatases acides.

Le domaine N-terminal de la kinase a une conformation qui correspond à un feuillet  $\beta$  plissé pouvant servir à recevoir un nucléotide de type ATP, lequel est complémentaire d'un segment de la PFK-1 suggérant que ces deux enzymes trouvent leurs substrats, ATP et Fru-6P, dans une géométrie similaire. Cette analyse indique que cet enzyme bifonctionnel est le produit probable de la fusion d'un gène codant pour la kinase et d'un autre gène codant lui pour la synthèse de la mutase/phosphatase [16].

## 3. CARACTERISTIQUES DE LA PFK-2/F-2,6 BISPHOSPHATASE

### a. Description

La PFK-2/FBPase-2 du muscle squelettique du rat a été purifiée jusqu'à homogénéité; sa structure et ses propriétés ont été déterminées. Le poids moléculaire de l'enzyme natif est de 100.000, les sous-unités ayant un poids moléculaire de 54.000. La composition de l'enzyme en acides aminés est semblable à la composition de l'enzyme de foie de rat et la séquence C-terminal (His-Tyr) est la même que pour celui-ci. Un peptide dont la séquence en amino-acides est Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Gln-Phe-Thr-Asn-Ser-Pro-Thr-Met-Val-Ile-Met-Val-Gly-Len-Pro-Ala-Trg a été isolé. Ce peptide est le même que celui du foie de rat contenant le site de phosphorylation excepté que, dans l'enzyme de muscle, les deux acides aminés amino-



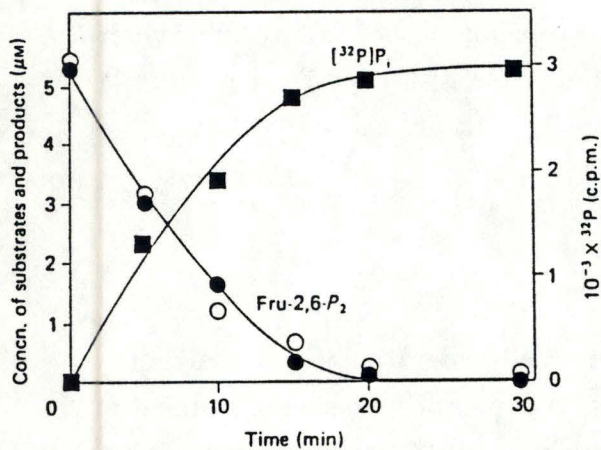


Fig 11 Release of [ $^{32}\text{P}$ ]P $_i$  from Fru-2,6-[2- $^{32}\text{P}$ ]P $_2$  by FBPase-2 from yeast [47].

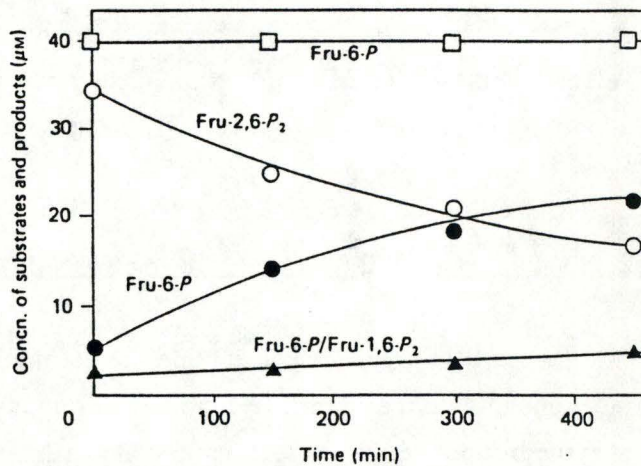


Fig 12 Specificity of FBPase-2: formation of Fru-6-P from Fru-2,6- $P_2$ , but not from Fru-1,6- $P_2$  [47].

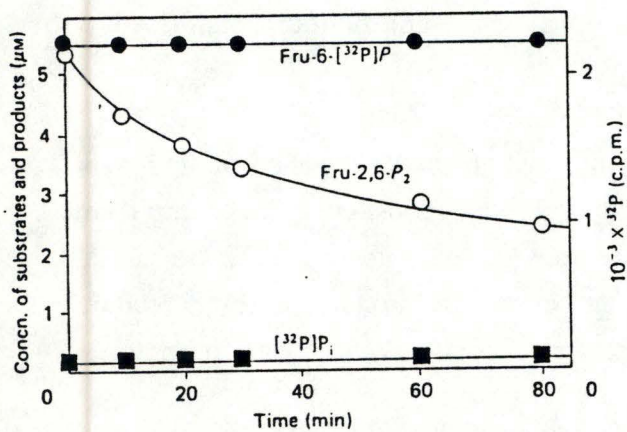


Fig 13 . Specificity of FBPase-2 from yeast: no release of phosphate from the 6-position of Fru-2,6- $P_2$  [47].



terminaux Gly, Ser-P sont remplacés, respectivement, par le Thr-Ala. Tout ceci permet de dire que la structure de l'enzyme du muscle de rat est très semblable à celle du foie de rat [18].

Ces caractéristiques de la PFK-2/FBPase-2, nous les retrouvons aussi dans le foie de poulet et dans le muscle de pigeon sauf que l'enzyme de foie de poulet est activé deux fois plus par incubation avec de l'ATP et en présence de protéine kinase dépendant de l'AMPc [15].

#### b. Affinité pour les substrats et régulation

Dans le foie et le muscle squelettique de rat, la valeur du  $K_m$  pour le fructose-6P et l'ATP de la PFK-2 sont respectivement de 56 et de 48  $\mu\text{M}$ . La valeur du  $K_m$  pour le fru-2,6-bP de la FBPase-2 est de 0,4  $\mu\text{M}$  et son  $K_i$  pour le fru-6P est de 12,5  $\mu\text{M}$ . L'enzyme est bifonctionnel et l'activité de la phosphatase est 2.5 fois plus grande que l'activité de la kinase. Ces valeurs qui concernent le foie sont très semblables pour celles concernant le muscle.

Chez *Euglena gracilis*, c'est un enzyme bifonctionnel localisé dans le cytosol. Le pH optimum pour l'activité de la PFK-2 est de 7.0. La courbe de saturation de l'enzyme en fonction de la concentration en ATP est de type hyperbolique et la valeur du  $K_m$  pour le substrat est de 0,88  $\mu\text{M}$ . La courbe de saturation de la FBPase-2 pour le fru-2,6-bP est quant à elle sigmoïdale et la valeur du  $K_{0.5}$  pour le substrat est de 70  $\mu\text{M}$ . Le pH optimum pour l'activité de la FBPase-2 est de 6.5. La courbe de saturation par le fru-2,6-bP est sigmoïdale et la valeur du  $K_{0.5}$  pour le substrat est de 1,29  $\mu\text{M}$ . Le fru-2,6-bP à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  inhibe faiblement l'activité de l'enzyme et celle-ci est cette fois complètement inhibée en présence de fru-2,6-bP à une concentration de 20  $\mu\text{M}$  [68] (figures 10, 11 et 12). Comme dans le foie de rat [60], dans celui de bovins [65], dans le coeur [68] et dans le foie de poulet [73], cet enzyme a été purifié jusqu'à homogénéité et identifié comme un enzyme bifonctionnel. Par contre, chez la levure, les deux activités enzymatiques sont séparables, ce qui fera l'objet du paragraphe suivant.

#### 4. LA PFK-2 ET LA FBPASE-2 : SEPARABLES CHEZ LA LEVURE

La fru-2,6-biphosphatase de la levure a été purifiée et séparée de la PFK-2 et de la phosphatase alcaline (figure 10). L'enzyme libère le Pi de la position 2 du fru-2,6-bP et forme le fru-6P. La FBPase-2 présente une cinétique hyperbolique en fonction de la concentration en fructose-2,6-bP avec un  $K_m$  d'une valeur de 0,3  $\mu\text{M}$ . L'enzyme est fortement inhibé par le fru-6P. L'inhibition est contrecarrée par la protéine kinase dépendant de l'AMPc qui cause l'inactivation de la FBPase-2, laquelle est réversible par l'action de la protéine phosphatase  $A_2$  (figures 14, 12 et 13).



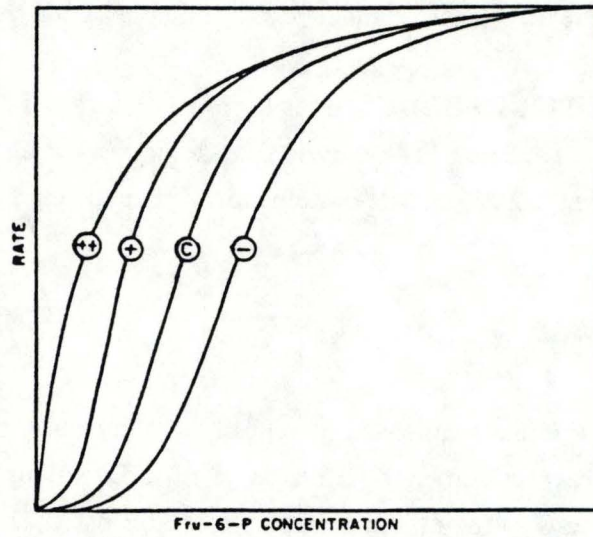


Fig 14 : Représentation schématique de l'effet des activateurs et des inhibiteurs de la PFK<sub>1</sub> sur la courbe de saturation du Fru-6-P [21].

-: Inhibiteurs.

c: Absence d'effecteurs.

+: Effecteurs positifs (désinhibiteurs).

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

La PFK-2 de levure comparée à l'enzyme de foie, montre une activation suite à une phosphorylation dépendant de l'AMPc.

### 5. LA PFK-2/FBPASE-2 ET CONTROLE DE LA GLYCOLYSE

Lorsque le glucose entre dans la cellule par un processus de diffusion facilitée ou grâce à des pompes ioniques, son passage au travers de la membrane plasmique provoque l'activation de l'adénylate cyclase. Cette dernière, grâce à l'ATP, permet la formation d'AMPc qui se combine à la protéine kinase A et libère son unité catalytique. Celle-ci peut alors phosphoryler plusieurs protéines, dont certaines sont impliquées dans la régulation de la glycolyse. La PFK-2 fait partie de ces protéines; une fois phosphorylée, elle peut synthétiser efficacement le fru-2,6-bP. Ce dernier peut alors stimuler efficacement la PFK-1.

En résumé, on voit que l'AMPc est le messenger secondaire du glucose. Ce messenger, en permettant la phosphorylation de la PFK-2, de la FBpase-1 et la formation de fru-2,6-bP, concourt avec ce dernier à stimuler la glycolyse et donc à inhiber la gluconéogenèse.

## C. CONTROLE DE L'ACTIVITE DE CERTAINS ENZYMES PAR LE FRUCTOSE-2,6-bP

### I. CARACTERISATION DE LA PFK-1 DEPENDANT DE L'ATP

La PFK-1 dépendant de l'ATP catalyse la formation du Fructose-1,6-P<sub>2</sub> et d'ADP à partir du Fructose-6-P et d'ATP selon l'équation suivante :



Comme elle contrôle la première étape irréversible de la glycolyse, on la considère comme un "pacemaker" de cette voie métabolique. L'hexokinase ne peut jouer ce rôle car le produit de son action, le glucose-6-P est convertible en glycogène, glucose et fructose-6P. Cette PFK-1 est caractérisée par deux propriétés cinétiques : l'inhibition par un excès d'ATP et la forme sigmoïdale de sa courbe de saturation par le Fructose-6-P (fig. 14) [21].



## 1. La PFK-1 à travers le monde du vivant

La PFK-1 des mammifères se présente sous forme d'un tétramère d'un PM d'environ 340.000. Différents isoenzymes, qui résultent de l'assemblage de plusieurs types de sous-unités, y sont présents. Les tétramères montrent des différences dans leur sensibilité aux divers effecteurs et dans leur tendance à former des agrégats de haut PM. Cette dernière tendance est réprimée par l'ATP et augmentée par le Fru-6-P, le Fru-1,6-P<sub>2</sub> et le Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Ces agrégats semblent avoir une plus grande affinité pour le Fru-6-P que les tétramères isolés [22].

L'inhibition par l'ATP des PFK-1 d'eucaryotes est fonction de la concentration en ions Mg<sup>2+</sup>. En effet, l'ATP libre est un bien meilleur effecteur que le Mg-ATP : son affinité pour le site inhibiteur est dix fois supérieure à celle du Mg-ATP. L'inhibition produite par ce nucléotide peut être contrecarrée par le 5'AMP qui lui se lie à un site distinct de celui de l'ATP. La présence de ces 2 sites fait de la PFK-1 le tampon de la charge énergétique de la cellule car elle ajuste la libération énergétique en fonction des dépenses et elle maintient un approvisionnement stable en nucléotide à haute énergie (avec la contribution de l'adénylate cyclase) pour à peu près une centaine de réactions [24]. En résumé, on peut dire que la PFK-1 est plus active quand la cellule a besoin soit d'énergie, soit d'éléments de synthèse, ceci étant signalé respectivement par un rapport peu élevé ATP/AMP et une faible concentration en citrate.

Certains ions modulent également l'activité de la PFK-1 des tissus animaux. Il en est ainsi des ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en concentration physiologique ( $\pm 0,5$  mM), cette activation étant plus importante en présence d'ions K<sup>+</sup>. Le phosphate est un puissant activateur de l'enzyme : il agit en synergie avec le 5'AMP et NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [24]. De plus, cette PFK-1 est aussi stimulée par 3 hexoses biphosphates qui sont le Gluc-1,6-P<sub>2</sub>, le Fru-1,6-P<sub>2</sub> et le Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Seul le second est un intermédiaire de la glycolyse. Le troisième est le plus puissant régulateur de cet enzyme. Ces trois hexoses biphosphates n'ont pas d'effets synergiques car le Fru-1,6-P<sub>2</sub> entre en compétition avec Fru-2,6-P<sub>2</sub> pour le même site allostérique [22].

La PFK-1, in vivo, est très sensible aux petites variations de pH. De plus, elle est fortement inhibée aux pH acides.

La PFK-1 des arthropodes et mollusques ne présente pas de différence fondamentale avec la PFK-1 des vertébrés. En voici quelques exemples :

1. chez la blatte *Periplaneta americana*, il existe un contrôle de l'enzyme musculaire pendant le vol. L'ADP, Fru-1,6-P<sub>2</sub> et le citrate n'ont aucun effet tandis que le NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, le Pi, le 5'AMP et le Fru-2,6-bP, ces deux derniers agissant en synergie, augmentent l'affinité de l'enzyme pour le Fru-6-P et diminuent l'inhibition due aux fortes concentrations d'ATP [25, 26].



2. chez le criquet pèlerin *Locusta migratoria* qui est, lui, caractérisé par une aptitude au vol prolongé, la diminution de la concentration en Fru-2,6-bP aux premiers stades du vol est en partie responsable de la diminution de l'activité de la PFK-1 et donc de la conservation des hydrates de carbone. Ici ce sont les lipides qui servent en majeure partie de source d'énergie [27].
3. Dans l'hépatopancréas et le muscle abdominal de l'écrevisse *Orconectes limosus*, l'affinité de la PFK-1 pour son substrat est modulée par les nucléotides adényliques [28].

Une différence capitale de la PFK des plantes, protistes et bactéries par rapport aux autres organismes est qu'elle n'est pas sensible au Fru-2,6-bP.

1. Chez les bactéries, la PFK-1 est typiquement un tétramère composé de sous-unités de 40.000 de PM chacune, soit une taille deux fois plus petite que les sous-unités d'eucaryotes. Ces dernières proviendraient peut-être d'un gène procaryotique dupliqué. Les auteurs suggèrent qu'après la duplication du gène, un des sites catalytiques aurait perdu son activité pour devenir le site de liaison du Fru-2,6-bP. La PFK-1 bactérienne est aussi différente de celle d'organismes eucaryotes par le fait que sa rétro-inhibition se produit par le phosphoénolpyruvate et non par l'ATP et qu'elle est généralement activée par l'ADP ou bien l'AMP [28, 29].
2. Chez le protozoaire *Trypanosoma cruzi*, on observe d'importantes différences dans la structure et les mécanismes de régulation de la PFK-1. Ainsi des concentrations élevées en ATP n'inhibent pas l'enzyme, ceci est à mettre en rapport avec le catabolisme inhabituellement élevé des hydrates de carbone chez ce parasite [30].

La PFK-1 de levure diffère de celle de mammifères par plusieurs propriétés. C'est un octamère, composé de quatre sous-unités  $\alpha$  (PM : 120.000) et de quatre sous-unités  $\beta$  (PM : 113.000). Par ailleurs, des études génétiques indiquent que les sous-unités  $\alpha$  jouent un rôle régulateur tandis que les sous-unités  $\beta$  sont responsables de l'activité catalytique de l'enzyme. Le Fru-2,6-bP est un puissant stimulateur de l'enzyme. Il ne diminue pas seulement le  $K_m$  pour le Fru-6-P mais de plus, il augmente de 2 à 3 fois sa  $V_{max}$  [24].



## 2. Modes de régulation de cette PFK-1

Comme on vient de le voir, la PFK-1 est affectée par une grande variété de signaux métaboliques. En 1980, on en recensait plus ou moins 23 effecteurs incluant le plus puissant d'entre eux : le fructose-2,6-bP [31] (figure 18). L'état d'aggrégation de l'enzyme constitue sans nul doute un de ses modes de régulation. Associé en polymère, il présente une activité accrue. Il semble que certains facteurs allostériques ainsi que la calmoduline contrôlent la formation de ces complexes [31, 32]. L'état d'oxydation des groupements-SH affecte fortement son activité : ainsi, l'oxydation des résidus cystéine entraîne l'inactivation de la PFK-1 mais est cependant retardé par l'ATP et la présence d'effecteur positif [31]. Enfin, il a été démontré que la PFK-1 de mammifère peut être phosphorylée de manière réversible. La PFK-1 du muscle squelettique de lapin peut être phosphorylée in vitro par la tyrosine kinase. Cette modification covalente se produit sur des résidus tyrosine de l'enzyme [33].

## II. CARACTERISATION DE LA PFK-1 DÉPENDANTE DU PYROPHOSPHATE

Cette enzyme encore appelée fru-6-phosphate-1 phospho-transférase ou PPI-PFK catalyse la réaction réversible suivante :



Elle a été découverte par Reeves [74] chez *Entamoeba histolytica* et est présente chez toutes les plantes et chez certaines bactéries. Seule l'enzyme de plante est stimulée par le fru-6-P. Ce dernier augmente l'affinité de la PFK-1 pour le PPI. La sensibilité de la PPI-PFK au fru-2,6-bP est fonction des conditions de dosage. Ainsi le  $K_a$  pour l'activateur est diminué de 2 à 3 fois quand la concentration en fru-6-P augmente. De plus, l'affinité pour le fru-2,6-bP dépend aussi de la source de l'enzyme. Par exemple, le PPI-PFK des tubercules de pomme de terre est extrêmement sensible au fru-2,6-bP. Son  $K_a$  atteint 1nM. Cette propriété a été mise à profit pour le dosage du fru-2,6-bP [13].

## III. PYRUVATE KINASE

La pyruvate/kinase catalyse, elle aussi, une autre réaction irréversible propre à la glycolyse. Cette enzyme transforme le phosphoénolpyruvate et l'ADP en pyruvate et en ATP. Dans la plupart des organismes, la pyruvate-kinase est stimulée par le fructose-1,6-bP qui transforme la courbe sigmoïdale de saturation par le phosphoénolpyruvate en une hyperbole. VAN SCHAFTINGEN [72] a montré que, chez les Trypanosomidae, la pyruvate kinase est



stimulée par des concentrations micromolaires de fructose-2,6-bP et que cet effet stimulateur est inhibé par des concentrations millimolaires en Pi. On peut obtenir un effet similaire avec le Fru-2,6-bP et le Fructose-1,6-bP mais pour cela, il faut des concentrations 4000 fois plus élevées pour ce dernier. Auparavant, MIYATAKE [66] a décrit une stimulation de pyruvate kinase d'*Euglena gracilis* par des concentrations très élevées, de l'ordre de 2mM, en fructose-2,6-bP mais sans toutefois s'assurer que cet effet était perdu après traitement de leur préparation de fructose-2,6-bP en milieu acide [13].

#### IV. FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE

La conversion du fructose-1,6-biphosphate en fructose-6-phosphate et en Pi est catalysée par une FBPase-1 spécifique qui exige, pour être active, la présence de  $Mg^{++}$ . L'activité de cet enzyme est une fonction hyperbolique de la concentration en fructose-1,6-biphosphate (le  $K_m$  est de l'ordre de 2 à 5  $\mu M$ ) mais est inhibée par des concentrations en substrat supérieures à 100-500  $\mu M$ . Ces propriétés sont communes à l'enzyme de foie, de rein et de muscle de mammifères, à l'enzyme du cytoplasme des plantes vertes et à celle de levures. A ces propriétés, s'ajoute celle d'être inhibée par des concentrations micromolaires en fructose-2,6-bP. Par contre, la FBPase-1 de chloroplastes, qui participe au cycle de Calvin, n'est pas inhibée par le 5'AMP et ne l'est que par des concentrations en fructose-2,6-bP 50 à 100 fois supérieures à celles requises pour inhiber l'enzyme de foie; l'enzyme de chloroplastes étant principalement contrôlé par des changements de son état d'oxydo-réduction sous l'action de la lumière [38]. Nous reprenons ci-dessous les caractéristiques de l'enzyme du foie de mammifère et de la levure.

L'inhibition de la FBPase du **foie** par le fructose-2,6-bP présente les trois caractéristiques suivantes :

- a) Elle est de nature compétitive, du fait qu'elle est plus intense aux faibles qu'aux fortes concentrations en fructose-1,6-bP.
- b) Elle transforme la courbe de saturation par le fructose-1,6-bP d'un mode hyperbolique en un mode sigmoïdal.
- c) Elle est synergique avec l'inhibition par le 5'AMP.

Les caractéristiques b et c, plus particulièrement le synergisme avec l'ATP, permettent d'émettre l'hypothèse que le Fru-2,6-bP est un inhibiteur compétitif allostérique qui induirait un changement conformationnel de la FBPase-1. Pour appuyer cette hypothèse, on a pu montrer



que l'augmentation de la température ou la présence de sulfosalicylate ou encore celle d'ion  $\text{Li}^+$ , ainsi qu'une légère protéolyse modifient considérablement l'inhibition par le fructose-2,6-bP. De plus, REYES et al [67] ont fourni la preuve remarquable de l'existence d'un site allostérique spécifique pour le fructose-2,6-bP. Ils ont traité la FBPase-1 en présence de N-éthylmaléimide, ce qui engendre un enzyme complètement désensibilisé à l'inhibition par le fructose-2,6-bP mais qui n'affecte pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat et sa sensibilité au 5'AMP [38].

Il ressort de tout ce qui précède le modèle d'inhibition suivant. Deux formes enzymatiques, A et M, sont considérées. En absence de fructose-2,6-bP, ces 2 formes ont la même affinité pour le substrat. Par contre, la forme A a plus d'affinité pour les deux inhibiteurs, qui sont le fructose-2,6-bP et l'AMP, que la forme M. Si on suppose que le fructose-2,6-bP se lie préférentiellement à la forme A et que, de ce fait, cette liaison exclut celle de fructose-1,6-bP, le  $K_m$  apparent de cette forme pour le F-2,6-bP sera augmenté en présence de l'inhibiteur en comparaison de celui de la forme M. Cette différence d'affinité des deux formes pour leur substrat rend compte de la sigmoïdité de la courbe de saturation engendrée en présence du fructose-2,6-bP. De plus, ce modèle offre une explication simple pour le synergisme entre cet ester biphosphorique et l'AMP. Par la suite, ce schéma a été modifié en un modèle comprenant cette fois trois états de manière à y intégrer le  $\text{Mg}^{++}$  [38].

La FBPase-1 de levure est fortement inhibée par le fructose-2,6-bP. L'inhibition est de type mixte (à la fois compétitive et non compétitive) avec, pour l'aspect compétitif, un  $K_i$  de l'ordre de 5nM et de 0,3  $\mu\text{M}$  pour l'aspect non compétitif. L'addition de glucose à une suspension de levures en phase stationnaire provoque une perte de 40 à 60% de l'activité de la FBPase-1. De plus, cette inhibition causée également par l'addition d'ionophore de protons, est concomitante à une augmentation transitoire de la concentration en 5'AMPc.

A partir d'une étude effectuée sur des extraits de levures préalablement filtrés sur Séphadex G-25, on a pu montrer que la forme phosphorylée de la FBPase-1 était moins sensible à l'inhibition au fructose-2,6-bP que la forme native et le 5'AMP, un inhibiteur non compétitif, contrecarrerait cette inhibition. De plus, cet antagonisme entre les deux inhibiteurs est plus prononcé avec la forme phosphorylée de l'enzyme. Il semblerait que, contrairement à ce qui se passe avec la FBPase-1 de foie, l'inhibition de l'activité de l'enzyme de levure par le fructose-2,6-bP n'est pas synergique avec l'ATP [13].

Les trois caractéristiques cinétiques décrites par VAN SCHAFTINGEN et HERS (1981a) [71] pour la FBPase-1 de foie ont été retrouvées dans le cas de l'enzyme de rein, de spermatozoïdes de rat, de spores de *Phycomyces blakesleanus*, du cytosol d'épinard, de l'endosperme de graines de soja. On peut encore ajouter que la FBPase-1 de *E. coli* est inhibée

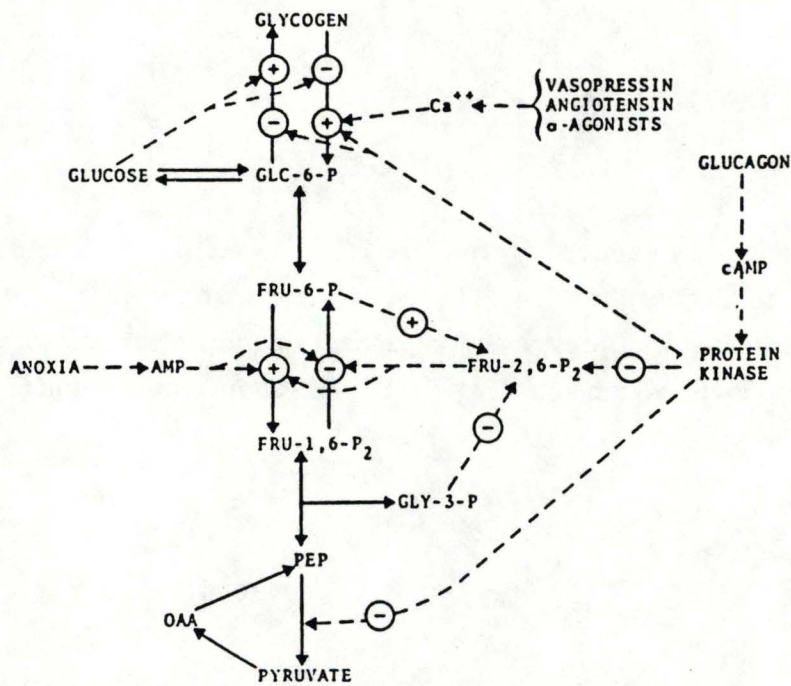


par des concentrations micromolaires de fructose-2,6-bP, alors que jusqu'à maintenant on n'a pas identifié cette molécule chez les bactéries [13].

#### V. AUTRES ENZYMES

Un effet stimulateur ou inhibiteur du fructose-2,6-bP a été décrit pour d'autres enzymes, tels que l'UDPG-phosphorylase, la tréhalose-phosphorylase et la 6-phosphogluconate-déshydrogénase. Il s'est avéré cependant que ces effets devaient être attribués à des artéfacts résultant de l'impureté des préparations enzymatiques étudiées ou du fructose-2,6-biphosphate utilisé [73].





**FIG 15** Regulation of liver carbohydrate metabolism by glucose and by hormones. Abbreviations: PEP = P-enolpyruvate; Gly-3-P = glycerol 3-phosphate (modified from Hers and Van Schaftingen, 1982)[22]

## CHAPITRE III. ROLE DU FRU-2,6-bP DANS LA REGULATION METABOLIQUE

La concentration cellulaire du fru-2,6-bP est contrôlée par l'activité relative de la PFK-2 et de la FBPase-2, soumises elles-mêmes à différents effecteurs et à des modifications covalentes. Dans le foie de rat, l'activation de la FBPase-2 par une protéine kinase dépendant de l'AMPc favorise la disparition du fru-2,6-bP. Par contre, chez la levure, cela conduit à une augmentation de la concentration en fru-2,6-bP. La propriété générale du fru-2,6-bP, à une exception près, celle du trypanosome, est de stimuler la PFK-1 et d'inhiber la FBPase-1. Le fru-6P accentue l'effet du fru-2,6-bP tandis que les esters phosphates à 3 carbones tels que le glycérol-3P, dihydroxyacétone P et le 3-P glycérate le diminuent [13].

### I. DANS LE FOIE DE RAT

Etant donné que le foie de rat est le modèle qui a été le plus étudié, nous nous en référons tout spécialement dans ce qui suit.

#### HOMÉOSTASIE ET CONTROLE HORMONAL DE LA BALANCE DU GLUCOSE

La première fonction du foie chez les mammifères est de maintenir un taux normal de glucose sanguin. Au cours du jeûne, le glucose est formé au dépens du glycogène et de précurseurs gluconéogéniques. Quand le glucose est abondant comme après un repas, il est transformé en glycogène et en graisses.

Le glucose intervient dans le métabolisme du glycogène, en causant l'inactivation de phosphorylase et, secondairement, l'activation de la synthase. Pour la glycolyse et la gluconéogenèse, les effets du glucose sont médiés par les variations de concentration en hexose-P et en fru-2,6-bP. Ce système est sous contrôle hormonal, faisant intervenir le glucagon et des agents  $\beta$ -adrénergiques comme la noradrénaline, la vasopressine et des agents  $\alpha$ -adrénergiques comme la phényléphrine, enfin l'AMPc et le  $Ca^{++}$ . Le glucagon favorise la gluconéogenèse alors que la vasopressine favorise la glycolyse [13] (figure 15).

Durant le jeûne, on observe dans le foie des taux de glycogène, d'hexose-P et de fru-2,6-bP relativement bas ainsi qu'une stimulation de la gluconéogenèse. Après nutrition ou après l'administration de glucose intragastrique, la synthèse de glycogène réapparaît endéans



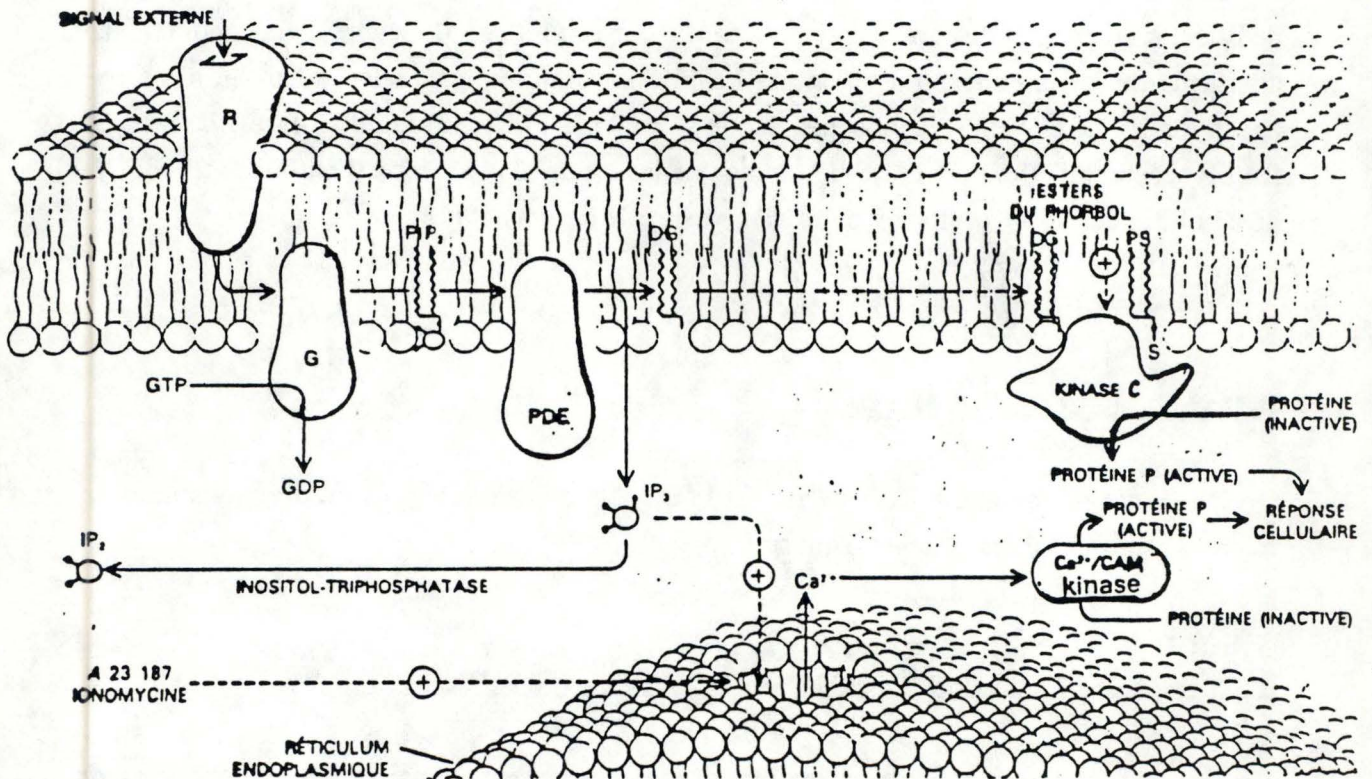


Fig.16 .: Modèle d'activation de la protéine kinase C.[80].

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



quelques minutes et le taux de fru-2,6-bP qui reste bas ( $< 1$  mmol/g) dans les premières heures, atteint une valeur maximale après 5 heures. La vitesse élevée à laquelle le glucagon est synthétisé maintient probablement la concentration en hexose-P basse et prévient ainsi la formation de fru-2,6-bP jusqu'à ce que les stocks de glycogène soient reconstitués.

Dans les hépatocytes isolés, la concentration en hexose-P et en fru-2,6-bP augmente en présence de glucose. Ceci est à mettre en relation avec la faible capacité de ces cellules isolées à synthétiser du glycogène. L'augmentation de la concentration en fru-2,6-bP est parallèle à celle du flux glycolytique à travers la PFK-1 [13].

Le glucagon induit dans le foie plusieurs changements métaboliques qui sont caractéristiques des conditions de jeûne. Il stimule la glycogénolyse, la gluconéogenèse et inhibe la glycolyse ainsi que la synthèse d'acides gras. Tous ces effets du glucagon sont le résultat de la formation d'AMPc et de l'activation de la protéine kinase dépendant de l'AMPc qui, dans le foie de rat, phosphoryle quatre enzymes : la phosphorylase kinase, le glycogène synthétase, la PFK-2/FBPase-2 et la pyruvate kinase. La participation du fru-2,6-bP lors de l'activation de la gluconéogenèse par le glucagon est plus importante chez l'animal nourri que chez l'animal à jeun où la concentration en fru-2,6-bP est toujours faible [36]. D'autres agents ou conditions provoquent une augmentation de la concentration en AMPc causant aussi une diminution de la concentration en fru-2,6-bP; ceci inclut l'isoprotérénol, agent  $\beta$ -adrénergique, la phényléphrine, agent  $\alpha$  adrénergique et l'exercice [37].

Sur des préparations isolées de foie, l'insuline a une action antagoniste à celle du glucagon ou des hormones adrénériques comme l'adrénaline. Son action sur l'activité de la PFK-2/FBPase-2 et sur le taux de fru-2,6-bP est l'inverse de celle du glucagon. On peut voir que l'addition d'insuline à des cultures d'hépatocytes de rat augmente l'activité de la PFK-2 tout en diminuant celle de la FBPase-2 avec pour résultat une concentration accrue en F-2,6-bP; elle augmente aussi l'activité de la pyruvate kinase et donc la glycolyse [34].

D'autres substances telles les esters de phorbol et les substances mitogéniques provoquent aussi des modifications de la concentration en fru-2,6-bP. L'O.A.G. (Oléyl, acétyl glycérol), le phorbol 12,13-dibutyrate et l'interleukine 4 par exemple, provoquent une augmentation en fru-2,6-bP dans les lymphocytes de la rate, ce qui augmente de 2 à 3 fois le taux de lactate largué. De même, l'exposition de cellules  $\beta$  du pancréas au phorbol 12,13 dibutyrate, à l'interleukine 4 ou à des polysaccharides augmente la concentration en fru-2,6-bP et donc le flux glycolytique dans ces cellules [77] (figure 16).

Les esters de phorbol qui miment l'action du diacylglycérol intracellulaire agissent via l'activation de la protéine kinase C sans affecter la concentration intracellulaire de calcium. Un des changements le plus rapide après l'exposition de lymphocytes aux esters de phorbol actifs est la translocation de la kinase C du cytosol vers les membranes, ce qui provoque son



activation. Ensembles, la mobilisation de calcium et la translocation de la kinase C stimulent la croissance des lymphocytes. Les effets des lectines mitogéniques comme la Concanavale A (ConA) sur les lymphocytes ont aussi été étudiés. Quand les lymphocytes de rate sont exposés à la ConA, il y a augmentation de la concentration en fru-2,6-bP et du relargage de lactate. La phytohémagglutinine, une autre lectine mitogénique, induit les mêmes changements.

## II. DANS D'AUTRES TISSUS

### 1. LES MUSCLES STRIES

Dans les muscles striés de rat, l'insuline et l'adrénaline augmentent le taux d'hexose-6P, de fru-2,6-bP et stimulent la production de lactate. Par contraste, les stimulations électriques de haute fréquence causent une diminution prononcée du contenu des cellules musculaires en fru-2,6-P<sub>2</sub> tandis que les stimulations de basse fréquence provoquent l'effet inverse.

Chez *Periplaneta americana*, le vol cause une augmentation de la concentration en fru-2,6-bP du muscle du thorax. Dans cette situation, la concentration en fru-1,6-bP est au moins 100 fois supérieure à celle du fru-2,6-bP, ce dernier étant beaucoup plus efficace comme activateur de la PFK-1 que le fru-1,6-bP.

Dans le cœur de rat, la concentration en fru-2,6-bP diminue de moitié durant le jeûne et de 20% lorsque l'animal est traité à l'alloxane. Elle y augmente après administration d'insuline à des animaux ayant jeûné pendant une nuit. Cette augmentation s'accompagne d'une stimulation plus importante de la PFK-2. Dans le cœur perfusé, le taux de fru-2,6-bP n'est pas affecté par l'adrénaline ou la noradrénaline et on n'observe pas d'augmentation de l'activité de la PFK et de stimulation du flux glycolytique [13].

### 2. LE TISSU ADIPEUX

Alors qu'en général l'insuline active la glycolyse dans le tissu adipeux, on observe parfois une augmentation et parfois une diminution du taux de fru-2,6-bP mesuré dans des bourrelets de graisse isolés ou dans des adipocytes isolés. La noradrénaline est aussi connue pour entraîner une diminution de la concentration en fru-2,6-bP dans les bourrelets de graisse mais non dans les adipocytes isolés. L'activation de la glycogénolyse par ces deux hormones



sur la glycolyse apparaît donc ne pas être médiée par le fru-2,6-bP [13]. Dans le cas de la noradrénaline, celle-ci pourrait résulter d'une stimulation de la PFK-1 par des acides gras libérés par lipolyse [44].

### III. DANS LA LEVURE

L'addition de glucose à une culture de cellules en phase stationnaire est suivie en deux minutes d'une augmentation de la concentration en fru-2,6-P<sub>2</sub> de 2 à 10 µM. Cet effet du glucose est médié par une augmentation de la concentration en hexose-6-P. Cependant, le glucose cause aussi une activation de la PFK-2 via sa phosphorylation par la protéine kinase dépendant de l'AMPc. Cette activation semble jouer un rôle majeur dans le contrôle de la concentration en fru-2,6-bP comme le montre l'observation suivante : quand l'augmentation de la concentration en AMPc est bloquée par la présence d'acridine orange ou par l'utilisation de mutants thermosensibles déficients en adénylate cyclase, l'activation de la PFK-2 n'a pas lieu et la concentration en fru-2,6-bP augmente à peine; cependant l'hexose-6P s'accumule de la même manière que dans les conditions "contrôles".

L'anoxie cause aussi une augmentation de la concentration en fru-2,6-P<sub>2</sub> et de l'activité de la PFK-2. Cependant, cet effet pourrait être simplement un effet du glucose puisque le milieu de culture utilisé pour la croissance anaérobie contient quatre fois plus de glucose que dans celui utilisé pour la croissance aérobie [13].

L'inhibition de la FBPase-1 par le fru-2,6-P<sub>2</sub> est chronologiquement le premier d'une série de 4 mécanismes par lesquels le glucose empêche le recyclage entre le fru-6P et le fru-1,6-P<sub>2</sub>. Elle est suivie par l'inactivation partielle de l'enzyme suite à sa phosphorylation, modification qui elle-même est grandement facilitée par le fru-2,6-P<sub>2</sub>. Cela pourrait expliquer que l'inactivation de la FBPase-1 est déficiente chez les mutants manquant de glucose-6P isomérase. Cette inactivation n'est probablement pas un moyen de contrôle très efficace de l'activité de la FBPase-1 puisqu'elle s'accompagne d'une diminution de la sensibilité de l'enzyme au fru-1,6-P<sub>2</sub>. La protéolyse et la répression sont les 3<sup>è</sup> et 4<sup>è</sup> mécanismes impliqués dans le contrôle de la FBPase-1 et il n'y a pas d'indications que ces processus puissent être contrôlés par le fru-2,6-P<sub>2</sub> [13, 41].

En résumé, il apparaît maintenant que, chez *S. cerevisiae*, l'AMPc est le second messager du glucose, lequel en induisant la phosphorylation de la FBPase-1 et la formation du fru-2,6-bP, joint avec l'augmentation de l'activité de l'hexokinase, stimule la glycolyse.



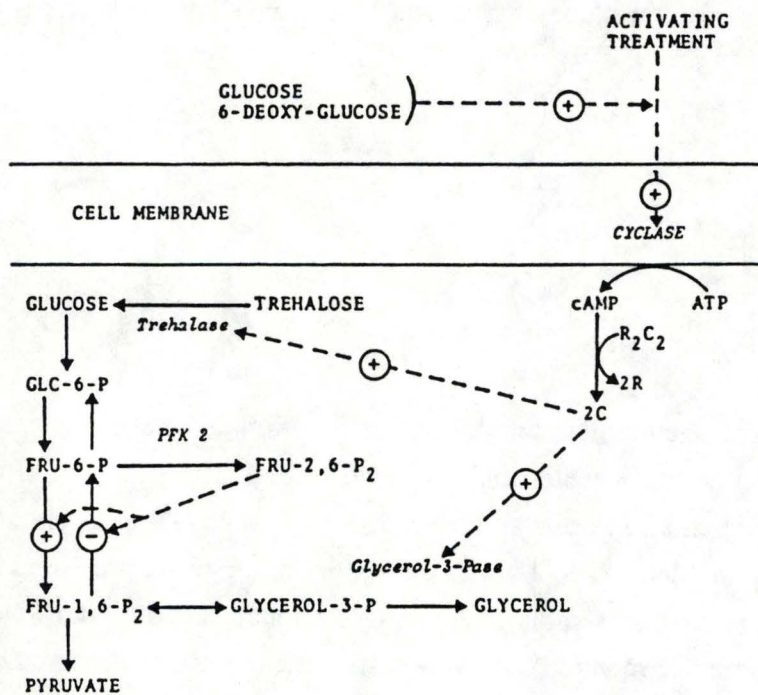


Fig 17 Regulation of the conversion of trehalose to glycerol in *Phycomyces* spores during the early phase of germination. [22]

#### IV. DANS LES SPORES DE CHAMPIGNONS

Les sporangiospores de *Phycomyces blakesleeanus* sont dormantes : elles ne peuvent germer dans un milieu de culture approprié sans être activées par un traitement spécifique. Si on arrête la dormance par un choc thermique, cet arrêt est directement suivi par une période critique de 15 à 30 minutes durant laquelle les spores ont besoin d'être incubées en présence de glucose ou de 6-désoxyglucose pour éventuellement germer. Cette période est caractérisée par plusieurs changements métaboliques qui sont grandement amplifiés en présence de glucose. Ces changements incluent l'activation de la tréhalase et de la glycérol 3-phosphatase, la formation d'AMPc, de fru-2,6-bP, fru-1,6-bP et la production d'à peu près 300  $\mu$ moles de glycérol par gramme de poids frais.

L'activation de la tréhalase et de la glycérol-3Phosphatase semblent être le résultat de leur phosphorylation par une protéine kinase dépendant de l'AMPc. Par contre, la PFK-2 et la FBPase-2 n'apparaissent pas être des enzymes phosphorylables dans ces spores puisque leur activité reste inchangée durant toute la période critique. L'augmentation de 20 à 40 fois du contenu en fru-1,6-bP pourrait bien être le résultat de l'augmentation de la concentration en hexose-6P. Par contre, on ne peut expliquer le fait que le contenu en fru-2,6-bP retourne à son taux basal après la période critique par une réduction de celui de l'hexose-6P. Les deux enzymes, PFK-1 et FBPase-1, présentes dans ces spores, sont sujettes à la régulation par le fru-2,6-bP. Dans les spores dormantes, une grande partie du fru-2,6-bP pourrait être rapidement dégradée par la FBPase-1 et donc incapable de stimuler la PFK-1. La large concentration en fru-2,6-bP associée à la rupture de la dormance, sature la PFK-1 mais suffit tout juste à inhiber la FBPase-1 en présence de fortes concentrations en fru-1,6-bP se trouvant dans les spores durant la période critique [13] (fig. 47).

#### V. CHEZ LES PLANTES

Le fru-2,6-bP semble être localisé dans le cytosol des cellules des plantes où il peut contrôler les activités de la FBPase-1 et de la PPK-PFK. Quand les feuilles d'épinard sont illuminées, le fru-2,6-bP augmente brusquement de 2 fois puis son taux retourne à son niveau initial après plusieurs heures. Cette augmentation de la concentration en fru-2,6-bP est probablement liée à l'accumulation d'hexose-6P et indirectement de sucrose puisque le fru-2,6-bP et l'hexose-6P s'accumulent plus rapidement quand l'exportation de sucrose est empêchée comme dans les feuilles détachées.



Le fru-2,6-bP pourrait jouer un rôle dans l'orientation de la photosynthèse vers la production d'amidon dans le chloroplaste ou de sucrose dans le cytosol. Au début de l'illumination, la faible concentration en fru-2,6-bP permet la conversion efficace de triose-P en hexose-6P et en sucrose [42, 43].

L'activité métabolique de tiges d'artichaux change considérablement quand elles sont coupées et incubées à 25°C. Cela inclut une augmentation progressive du taux de respiration et du taux de synthèse des protéines. Un des événements les plus impressionnants est l'augmentation considérable de la concentration en fru-2,6-bP (de 40 à 250 fois). Cette augmentation ne peut pas être estimée par un changement de l'activité de la PFK-2 ou de la concentration en fru-6P ou encore de celle de l'ATP. Ce n'est pas non plus dû à un changement de température mais semble résulter simplement de la coupure [43].

## VI. CONCLUSION : LE FRU-2,6-bP, SIGNAL GLYCOLYTIQUE

Le fru-2,6-bP n'est pas à proprement parlé un métabolite mais plutôt un signal moléculaire véhiculant une série d'informations intra-cellulaires ou extra-cellulaires. La principale information intra-cellulaire convoyée par le fru-2,6-bP semble être le rapport  $C_6/C_3$  des esters phosphoriques : les deux groupes de métabolites glycolytiques sont séparés par l'interconversion d'étapes irréversibles Fru-6P/Fru-1,6-bP. L'information extra-cellulaire fait intervenir l'AMPc qui, dans le foie et la levure, constitue un signal de la situation nutritionnelle.

Bien que le fru-2,6-bP et l'AMPc sont des signaux présents très tôt dans l'évolution du vivant, leur phylogénèse est cependant différente puisque le fru-2,6-bP est trouvé dans les plantes mais pas chez les procaryotes, au contraire de l'AMPc. Etant donné son rôle chez *E. coli* et dans le foie, l'AMPc a été parfois appelé signal de faim, lequel annonce l'absence de glucose. Nous avons vu que ce concept n'est pas applicable à la levure, chez laquelle le glucagon et l'AMPc ont des effets synergétiques. Au contraire de l'AMPc, la fonction du fru-2,6-bP ne semble pas avoir été modifiée durant l'évolution. Il stimule la glycolyse et inhibe la gluconéogenèse. C'est son rôle le plus apparent dans le foie et chez *S. cerevisiae*. Il accomplit son effet par une interaction directe avec quatre enzymes pour lesquels il a une grande affinité, une propriété qui peut être associée à sa structure avec son groupe furanosyl, sa configuration anomérique en boucle et ses deux groupes phosphates fortement chargés, ce qui explique qu'il n'existe que sous un nombre limité de conformations.

On doit cependant reconnaître que le rôle du fru-2,6-bP n'est pas clair dans plusieurs tissus et cellules où les changements de sa concentration ne sont pas corrélés à ceux du taux glycolytique ou gluconéogénique. Cela s'observe lors de la remise en route des activités métaboliques dans les tiges coupées, les graines en germination et dans les cultures de fibroblastes. Ces effets indiquent que le fru-2,6-bP peut avoir d'autres rôles que celui du contrôle du métabolisme des hydrates de carbone [43].

Une dernière question : pourquoi un métabolite aussi simple que le fru-2,6-bP a-t-il été découvert si tard [70] . La réponse est probablement liée à ses trois propriétés qui sont : son acido-labilité, sa présence dans les cellules à faibles concentrations (micromolaires), et le fait qu'il est un pur régulateur et non pas un intermédiaire de la voie métabolique [13].



## CHAPITRE IV. LA BRANCHIE : ORGANE OSMOREGULATEUR ET LIEU DE REGULATION IONIQUE

### A. INTRODUCTION

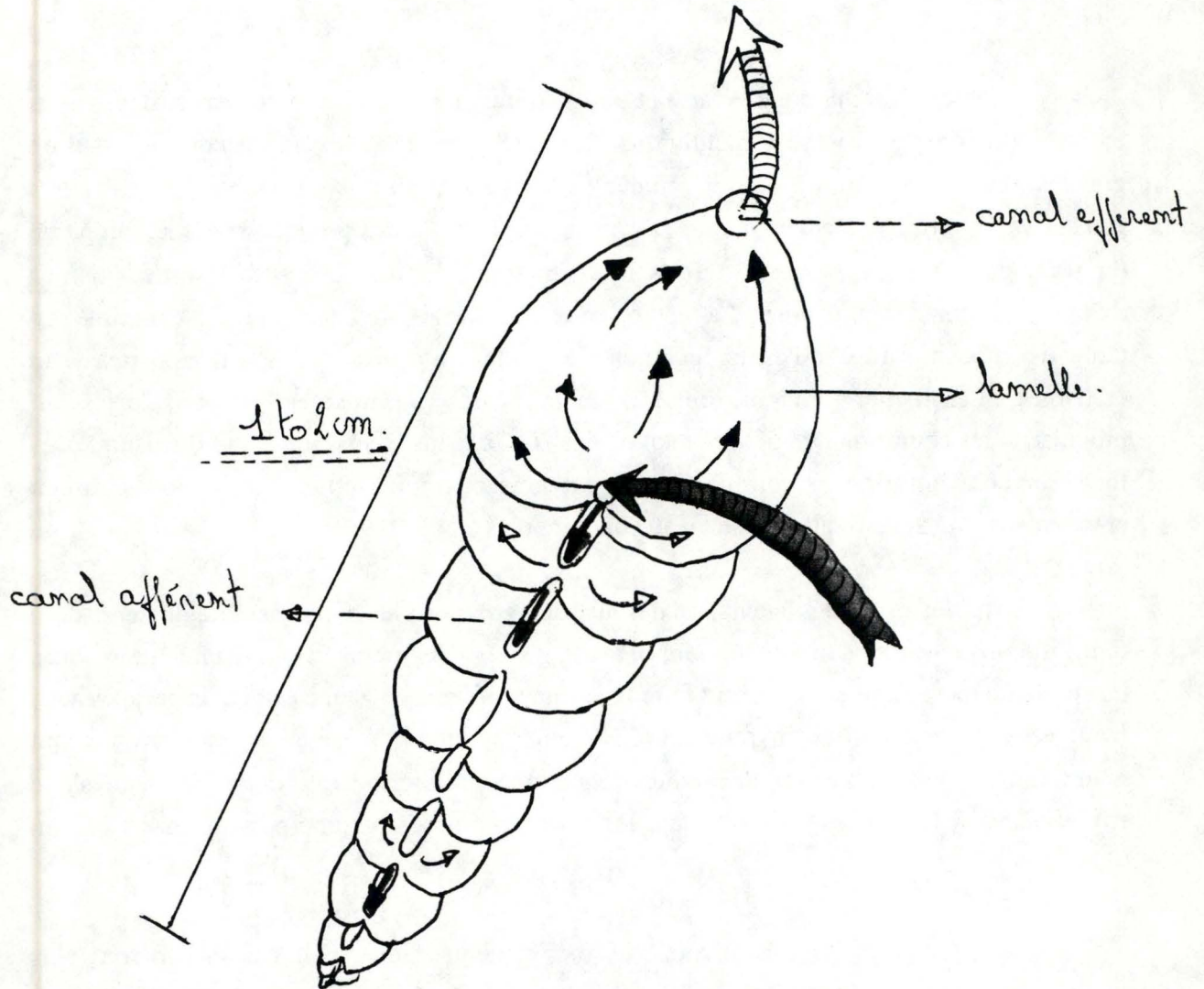
L'observation du monde marin et plus particulièrement du groupe des crustacés nous montre que l'on peut mettre les individus dans deux groupes : les animaux supportant de grandes variations de salinité dans le milieu, les "euryhalins" et ceux ne supportant pas ou très peu ces variations, les "sténohalins". *Eriocheir sinensis* sur lequel porte notre étude, fait partie du premier groupe. Nous porterons donc un regard plus long sur les mécanismes d'osmorégulation des euryhalins. La relation entre osmolarité externe et interne est exprimée en terme d'osmoconformité et d'osmorégulation. Les osmoconformes minimisent les pertes d'eau et d'ions. Les osmorégulateurs ont mis au point des mécanismes compensatoires qui produisent des contre-mouvements de soluté égaux aux gains et aux pertes par diffusion. Dès lors leur concentration osmotique interne est plus ou moins constante, celle du milieu environnant pouvant être plus basse ou au contraire plus élevée.

Parmi les osmorégulateurs, on définit deux groupes : les hyper-osmorégulateurs dont font partie *Eriocheir sinensis* et *Carcinus maenas*. Ce sont des animaux qui vivent en eau douce ou en eau de mer diluée et ils doivent faire face à un problème de gain d'eau ou de perte d'eau. L'autre groupe est celui des hypo-osmorégulateurs, comme le *Pachygrapsus crassipes*, qui maintiennent leur hémolymphe à une concentration inférieure à celle de l'eau salée environnante. Ils doivent donc résoudre les problèmes posés par une perte d'eau et un gain d'ions.

Tous les épithélia sont le siège de mouvements d'ions mais certains le sont plus particulièrement et de manière plus importante vis-à-vis de l'hémolymphe; ce sont les cellules épithéliales du tégument, de l'intestin, des organes excréteurs (chez le crabe, ce sont les glandes antennaires) et des branchies. Si on dispose de peu d'éléments sur la part jouée par les 2 premiers, il est maintenant bien établi que l'organe excréteur agit sur la régulation du volume de liquide interne et sur la réabsorption compensatoire de NaCl chez plusieurs hyperrégulateurs. Sa contribution dans la balance ionique est minime si pas nulle. Les branchies par contre jouent un rôle primordial dans l'osmorégulation [2]. Nous en parlerons plus en détail dans les paragraphes suivants [45, 46].

Fig 18: SCHEMA OF THE GILL OF THE CRAB E. SINENSIS.

---





## B. ORGANES INCLUS DANS L'OSMOREGULATION

Le tube digestif est le site d'absorption anale et orale d'eau et d'ions. Les découvertes d'un potentiel transmembranaire et d'une importante activité ATPasique inhérente aux pompes ioniques, notamment chez *Carcinus maenas*, ont consolidé cette hypothèse de centre iono- et osmorégulateur [45]. Les glandes antennaires jouent également un rôle dans l'osmorégulation ou les mouvements ioniques sont localisés dans l'épithélium du sac terminal. Le lien le plus important de l'osmorégulation est la branchie qui est l'objet du paragraphe suivant [45, 47].

### LA BRANCHIE : ORGANE OSMORÉGULATEUR

#### a) Aspects structuraux

Les branchies de crustacés jouent un rôle majeur dans les mécanismes de respiration mais aussi de régulation osmotique et ionique. Leur nombre est variable suivant les espèces. Chez *Eriocheir sinensis*, il y a 12 branchies, chacune est composée d'un rachis médian portant latéralement deux rangées de nombreux saccules lamellaires empilés dans lesquels circule l'hémolymphe (fig.18). Le tégument branchial est constitué d'un épithélium situé juste en-dessous de la cuticule. On y trouve aussi d'autres types de cellules telles des cellules piliers, des néphrocytes (cellules phagocytaires fixées) et des axones.

Les expériences de Koch utilisant entre autre la coloration à l'argent a été utilisée pour identifier ici les régions de la cuticule d'arthropodes perméables à l'ion  $\text{Cl}^-$  et donc inclus vraisemblablement dans les mouvements d'ions. Cette technique a permis de montrer que l'épithélium de branchie est le site principal de la régulation ionique du milieu interne du crustacé.

Chez le crabe chinois, *Eriocheir sinensis*, on a montré que seules les trois paires de branchies postérieures donnent une coloration positive à l'argent. De tels résultats démontrent les différences structurales entre les branchies antérieures et postérieures, reliées peut-être à des différences fonctionnelles.

Des études en microscopie électronique ont confirmé cette hypothèse dans le cas d'*Eriocheir sinensis*. Chez cette espèce, on a trouvé d'importantes différences dans l'ultrastructure entre les deux types de branchies (fig.19) : l'épithélium des feuilletts branchiaux postérieurs est plus épais (supérieur à  $10 \mu\text{m}$ ) que celui des branchies antérieures ( $2-4 \mu\text{m}$ ) et sa cuticule tend à être plus fine ( $0,3 \mu\text{m}$  dans les branchies postérieures contre  $1 \mu\text{m}$  dans les branchies antérieures). Dans les antérieures, les noyaux des cellules épithéliales fines débordent généralement dans l'espace occupé par l'hémolymphe. Le côté apical des cellules juste en-dessous de la cuticule est



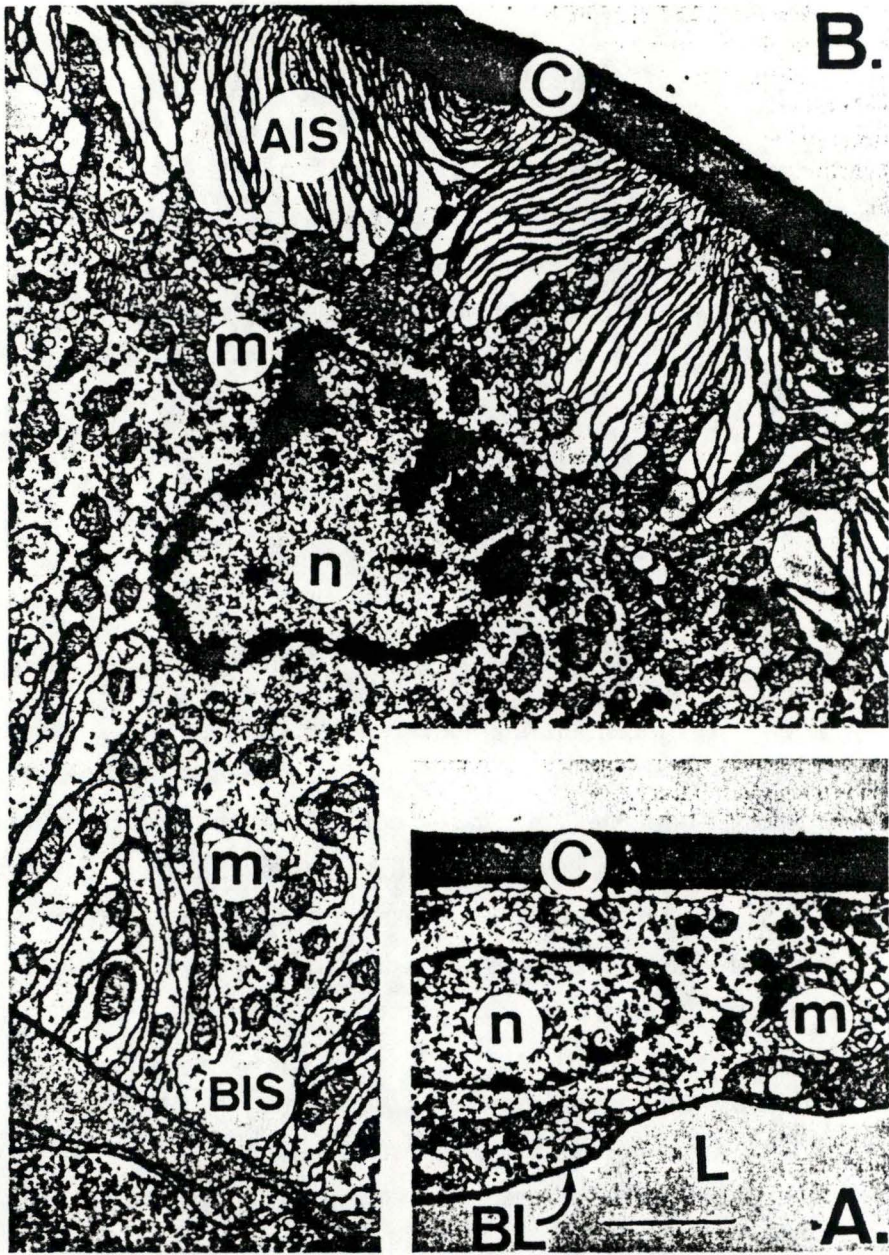


Fig. 19 . Ultrastructure of epithelial cells from gill lamella of the chinese crabs *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater. A Anterior gills; B posterior gills ( $\times 17,000$ ; bar =  $1 \mu\text{m}$ ). C Cuticle; m mitochondria; n nucleus; AIS apical infolding system; BIS basolateral infolding system (after Gilles and Péqueux 1981; Barra et al. 1983) [82].



très légèrement plissé, ce qui laisse un compartiment extracellulaire sous la cuticule extrêmement réduit. La quantité d'organelles intracellulaires est très limitée et la membrane plasmique ne montre pas d'importants replis baso-latéraux. Ce type d'épithélium exerce essentiellement un rôle respiratoire.

Chez les crabes acimatés aux milieux dilués, les branchies postérieures sont caractérisées par un réseau bien développé de larges replis apicaux qui produisent sous la cuticule un vaste compartiment extracellulaire. De profonds replis baso-latéraux entrent en contact étroit avec les membranes de nombreuses mitochondries. Tout ceci confère à ce tissu les caractéristiques d'un épithélium "transporteur d'ions". Le contrôle de l'osmolarité est par conséquent contrôlé par les trois paires de branchies postérieures chez *Eriocheir sinensis* [45, 46].

#### b) Les aspects physiologiques

Comme les différences ultrastructurales entre branchies postérieures et antérieures le laissent supposer, il existe bien entre elles des différences physiologiques. Prenons comme exemple le transport sodique à partir du milieu externe. Il a été établi que le flux de  $\text{Na}^+$  dans les branchies antérieures du crabe *Eriocheir sinensis* est essentiellement passif. Néanmoins, cela n'empêche pas l'existence de mécanismes réduisant les pertes associées à ce flux passif. En effet, la perméabilité des branchies antérieures au  $\text{Na}^+$  décroît en présence d'une faible concentration de cet ion dans le milieu. Ceci diminue donc la perte de cet ion lors de l'acclimatation d'animaux à de faibles salinités. Par contre, l'entrée de  $\text{Na}^+$  à partir du milieu externe à travers l'épithélium des branchies postérieures est le résultat d'un transport actif. Cet influx de  $\text{Na}^+$  est vraisemblablement couplé à l'expulsion de  $\text{NH}_4^-$  ou de  $\text{H}^+$  [45, 46].

### C. ROLE DES FACTEURS HORMONAUX ET DES BIOAMINES SUR LA BRANCHIE

L'activité physiologique et métabolique des invertébrés, comme celle des vertébrés est soumise au contrôle de plusieurs hormones. Celles-ci sont produites et stockées dans différents organes neuroendocriniens et véhiculées par la circulation sanguine. Les facteurs hormonaux et les bioamines agissent à hauteur de nombreux tissus dont vraisemblablement la branchie.



## 1. LES FACTEURS HORMONAUX

Parmi les neurosécrétions produites par les pédoncules oculaires des crustacés, le facteur hyperglycémiant (CHH) agit au niveau des branchies. Ainsi, il stimule la glycogénolyse chez *Uca pugilator*. L'injection de nucléotides cycliques (AMPc et GMPC) induit le même effet chez d'autres crabes. Dès lors, on peut supposer que ceux-ci sont les intermédiaires intracellulaires de son action [84, 85, 86].

Dans un autre centre endocrinien, les ganglions thoraciques, on a découvert une hormone antidiurétique qui diminue la perméabilité à l'eau dans les branchies de crabes hyperrégulateurs acclimatés à l'eau de mer diluée ou à l'eau douce. La perméabilité du tube digestif de *Gecarcinus lateralis* est régulée aussi par des extraits de ces mêmes organes [87, 88].

## 2. LES BIOAMINES

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

Chez un crustacé hyperrégulateur *Callinectes sapidus*, la dopamine et l'octopamine favorisent la prise de  $\text{Na}^+$  par la branchie. Le même effet a été observé lorsque cet organe est perfusé avec le dibutyryl-C AMP (analogue de l'AMPc). Puisque ces deux hormones extraites de l'organe péricardique augmentent la concentration en AMPc dans les branchies, il est vraisemblable que ces substances soient des facteurs de l'hémolymphe qui favorisent la prise de  $\text{Na}^+$  à travers l'épithélium [89, 90]. Ces arguments et d'autres encore permettent d'affirmer que des hormones et des bioamines modulent la perméabilité des parois cellulaires branchiales et y modifient le taux de 5'AMPc. Par ailleurs, des protéines kinases, molécules ubiquitines, ont été identifiées dans de nombreux tissus de crustacés dont, à titre d'exemple, les protéines kinase A et G dans les branchies du homard [91].

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



**MATERIEL ET  
METHODES**

# CHAPITRE I. MATERIEL BIOLOGIQUE

## 1. INTERET DES RECHERCHES SUR LES CRUSTACES

L'étude des invertébrés est intéressante car ces animaux sont situés au sommet d'une voie évolutive, ce qui permet la comparaison de leurs mécanismes d'adaptation avec ceux des vertébrés. Cela permet, d'une part, une meilleure compréhension des mécanismes de ces derniers et, d'autre part, cela montre que les solutions adoptées par des espèces vivantes très éloignées présentent beaucoup de similitudes. Mais leur étude est amplement justifiée par :

- leur importance économique : la teneur élevée en protéines de la chair de ces animaux en fait un aliment très recherché et qui entraîne une pêche intensive de diverses espèces dont les plus connues sont la crevette, le homard, l'écrevisse, ... La reconstitution des stocks naturels et le développement que connaît l'exploitation d'élevages de crustacés le long des côtes de pays à forte densité de population passe par une connaissance beaucoup plus approfondie de ces animaux.
- leur importance écologique : les crustacés sont un maillon capital dans la chaîne alimentaire. Ils constituent la nourriture principale de nombreuses espèces de poissons et, de plus, de nombreux crustacés sont détritivores ce qui leur permet de se situer en début et fin de la chaîne alimentaire.
- leur importance médicale : la chitine, polymère de N-acétyl glucosamine, qui compose la carapace des crustacés peut être transformée en chitosan. Ce composé qui se présente sous forme de fibres peut être implanté sous la peau sans provoquer de réaction de rejet de la part de l'organisme. De plus, il se résorbe lentement pour finir par disparaître complètement. Comme le chitosan facilite aussi le développement de bactéries riches en lactase, son administration à des individus déficients en cet enzyme favorise une meilleure assimilation du lait. Entre plusieurs espèces de crabes sont des vecteurs de parasites tels la douve pulmonaire du genre *Paragominus* et de la filaire *Onchocerca volvulus*.

## 2. DESCRIPTION DE L'ANIMAL ET POSITION SYSTÉMATIQUE

*Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1854) dont le nom commun est "crabe chinois", est un arthropode crustacé. Ses cinq paires de pattes et son abdomen caché sous le



céphalothorax en font un décapode brachyoure. Il représente une des deux espèces de crabe chinois du genre *Eriocheir*. C'est au début du siècle (1912) qu'il a été introduit accidentellement par les routes commerciales maritimes en Allemagne d'où il s'est étendu à toute l'Europe de l'Ouest. Les touffes de poils sur ses chélicèdes sont très caractéristiques, particulièrement chez le mâle. *Eriocheir sinensis* vit en eau douce mais migre vers la mer au moment de la reproduction. Il présente une teinte vert-gris et mesure une soixantaine de millimètres de large au niveau du bouclier céphalo-thoracique (figure 1).

### 3. STABULATION DES ANIMAUX

En laboratoire, les crabes sont stockés en eau douce courante, oxygénée et maintenue à une température constante proche de 16°C ( $\pm 2$ ). Ils sont normalement nourris trois fois par semaine d'aliments de synthèse pour truites : ARCA (EUROFISH). Afin d'éviter toute perturbation métabolique provoquée par l'ovogenèse, les individus testés sont exclusivement des mâles. Ceux-ci sont reconnaissables à la forme triangulaire de leur abdomen (arrondi chez la femelle).

## CHAPITRE II. PROCEDURES PREPARATIVES

### 1. PRELEVEMENT DES ORGANES

Après avoir tué l'animal, le plus rapidement possible, nous découpons le bouclier céphalo-thoracique dorsal. Les branchies apparaissent disposées latéralement dans les chambres branchiales. Elles sont isolées et soit congelées (-84°C) soit utilisées directement. Dans ce cas, elles sont débarassées du rachis calcifié pour être ensuite sèchées sur papier filtre, pesées et découpées en morceaux en vue de l'homogénéisation. Cette succession d'opérations doit être exécutée rapidement car, par exemple, chez la souris décapitée, le contenu en Fru-2,6-bP du foie a diminué de 50% après 10 minutes.

### 2. TRAITEMENT DU TISSU BRANCHIAL

Les branchies sont homogénéisées dans un volume de  $\pm 0,9$  ml de NaOH 50 mM au moyen d'un homogénéiseur de type "Kontes glass Co-Dual R 20" constitué d'un tube et d'un piston en pyrex. Ce dernier est monté sur une foreuse tournant à 2800 rpm (position lièvre). L'homogénéisation est réalisée par  $\pm 12$  passages du piston pendant deux fois trente secondes à dix secondes d'intervalle. Ces branchies sont homogénéisées dans un volume de  $\pm 0,9$  ml de NaOH 50 mM pour une branchie d'un poids de 60 à 80 mg. Le pH de l'homogénat doit être supérieur à 11. De telles conditions dénaturent les protéines et stabilisent le Fru-2,6-bP. L'homogénat obtenu est ensuite chauffé à 80°C pendant cinq minutes. Ce chauffage permet la destruction complète du Fru-6-P qui est le substrat de la PFK-1. Par la suite, l'échantillon est centrifugé à 5000 x g pendant cinq minutes, ce qui permet d'obtenir un premier culot, résultant de la précipitation des protéines branchiales; le surnageant de cette opération est neutralisé avec de l'acide acétique 1 M en présence d'Hépes 20 mM. Cela a pour résultat de précipiter les protéines restantes qui sont éliminées par une seconde centrifugation à 5000 x g pendant 5 minutes. Le Fru-2,6-bP se trouve dans le dernier surnageant. Gradé à froid, il n'est stable qu'une journée. Il peut être stocké à -20°C.



### 3. TECHNIQUE DE PERFUSION DES BRANCHIES

#### A. PRINCIPE

Elle consiste à faire circuler une solution isotonique à l'hémolymphe appelée solution "IN" dans les branchies isolées qui baignent dans une solution de même composition ionique (solution "OUT").

#### B. COMPOSITION DE LA SOLUTION ISOTONIQUE (RINGER "EAU DOUCE")

NaCl :	240 mM
KCl :	5 mM
MgCl <sub>2</sub> :	12.5 mM
CaCl <sub>2</sub> :	12.5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	8.8 mM

Le pH est ajusté à 7.6 avec du TRIS.

#### C. MODE OPERATOIRE

Après avoir ôté la carapace céphalo-thoracique, chaque branchie est rincée abondamment dans la solution isotonique et l'hémolymphe résiduelle interne est expulsée par cette même solution au moyen d'une seringue. Un cathétère est placé dans le vaisseau afférent et un autre efférent de celle-ci. Ils sont fixés par une petite pince en plexiglas. La branchie est alors immergée dans 15 ml de solution saline dénommée solution d'incubation ou solution "OUT". Le cathétère fixé dans le canal afférent est branché sur une ampoule contenant la solution de perfusion ou solution "IN" enrichie ou non de plusieurs effecteurs du transport ionique (AMPc, O.A.G). 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/min. La solution circulant dans la branchie est recueillie dans un récipient par l'intermédiaire du cathétère placé dans le canal efférent. Le milieu d'incubation est oxygéné ce qui accroît la viabilité des branchies.

#### D. MESURE DE LA DIFFERENCE DE POTENTIEL

La différence de potentiel qui apparaît entre le milieu "OUT" et le milieu "IN" est liée à l'activité des pompes ioniques responsables des 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 est placée dans le récipient où est recueillie la solution de perfusion. Les deux électrodes sont connectées à un électromètre (Metrohm E 630) [6].

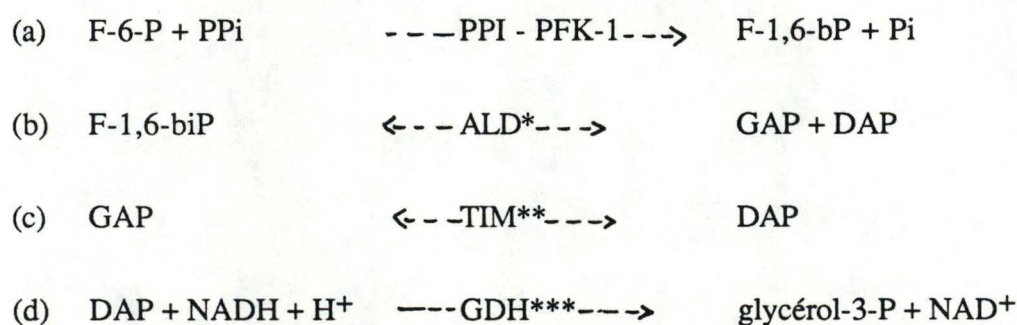


## CHAPITRE III. DOSAGE DU FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATE

### 1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

La méthode est celle de Van Schaftingen [14] modifiée par Bruni [78].

F-2,6-bP



GDH\*\*\* = glycérol-3Phosphate déshydrogénase

TIM\*\* = triose-P isomérase

ALD\* = aldolase

GAP = D-glycéraldéhyde-3-phosphate

DAP = déhydroxyacétone phosphate

L'activité de la PPI-PFK est essentiellement dépendante de la présence de fru-2,6-bP. La séquence des réactions décrites ci-dessus amène à la formation de NAD<sup>+</sup>. L'addition d'un colorant (le meldola blue) au NADH donne un produit qui est de plus en plus décoloré au fur et à mesure de la diminution de la concentration en fru-2,6-bP. En effet, moins il y a de fru-2,6-bP, plus il y a de NADH susceptible de réagir avec le meldola blue et plus la décoloration est importante. La lecture de l'absorbance de ce produit à coloration variable se fait à 540 nm et la variation de celle-ci par unité de temps est une fonction hyperbolique de la concentration en fru-2,6-bP.

Nous utilisons un spectrophotomètre capable d'analyser des échantillons placés sur une plaque multipuits. Cette méthode offre plusieurs avantages :

- 1) Dans la plaque ELISA, il y a 96 puits, ce qui permet de pouvoir doubler, tripler,... les tests, de faire une moyenne statistique et d'avoir un résultat statistiquement plus proche de la réalité.
- 2) Le spectrophotomètre analyse une plaque ELISA en moins d'une minute, ce qui nous donne rapidement les mesures. Ceci est un avantage appréciable lorsqu'on sait que le complexe coloré meldola blue-NADH n'est stable que pendant 20 à 30 minutes.

## 2. REACTIFS ET SOLUTIONS

1. Tris/acétate (Tris 1M, pH 8)
2. Acétate de magnésium (0.1 M)
3. Fructose-6-phosphate (F-6-P, 0.1 M)
4. Mixture NADH : Tris/Mg<sup>2+</sup>/F-6-P/NADH (Tris, 100 mM; Mg<sup>2+</sup>, 4 mM; F-6-P, 2 mM; NADH, 0.3 mM)
5. Pyrophosphate (10 mM)
6. Fructose-2,6-biphosphate (10 mM)
7. Solution d'enzymes auxiliaires : elle est préparée dans du tampon Tris/acétate 25 mM pH 8,0 contenant du NaCl 50 mM et de l'albumine sérique 0.2% et 5 U/ml d'aldolase, 17 U/ml de glycérol-3-phosphate déshydrogénase et 50 U/ml de triose-P isomérase. Cette solution enzymatique a été au préalable débarrassée du sulfate d'ammonium qu'elle contient par filtration sur un tamis moléculaire (Séphadex PD 10). On inclut extemporanément dans la mixture 0.1 U/ml de phosphofructokinase dépendante du pyrophosphate.

## 3. MODE OPERATOIRE

Le volume de l'échantillon de F-2,6-bP est de 10 µl. On y ajoute 250 µl d'une mixture qui contient : 5,6 ml d'H<sub>2</sub>O, 1,6 ml de la solution d'enzymes auxiliaires, 8 ml de la solution de NADH et 1,6 ml de la solution de pyrophosphate.

On laisse incuber pendant 20 minutes à 30°C, puis on arrête la réaction avec 25 µl de SDS 10%. Ensuite on ajoute 75 µl de meldola blue 0.3% et la plaque est placée sur un agitateur pendant 20-25 minutes, période après laquelle les absorbances sont analysées au spectrophotomètre.



Le volume final à l'intérieur d'un puit est de 360  $\mu$ l.

#### **4. COURBE ETALON ET COURBE DES DILUTIONS**

L'étalonnage est réalisé à partir de concentrations croissantes en F-2,6-biP allant de 0.05 pmoles à 1.25 pmoles par  $\mu$ l. Dans ces conditions, il existe une relation linéaire entre l'augmentation d'absorbance et celle du F-2,6-biP. La détermination de sa concentration dans les deux types de branchies se fait sur le dernier surnageant que l'on dilue entre 2 et 10 fois dans du NaOH 10 mM.

## CHAPITRE IV. ORIENTATION DU TRAVAIL

Le problème majeur auquel les crustacés euryhalins ont trouvé une solution est l'adaptation osmotique à différents milieux extérieurs grâce au transport ionique branchial. Ces transports d'ions plus intenses en eau douce demandent une plus grande quantité d'énergie, celle-ci étant fournie en majeure partie par la glycolyse. La régulation de cette dernière est un mécanisme relativement complexe faisant intervenir un grand nombre d'effecteurs. Par exemple, pour la PFK-1, enzyme-clef de cette glycolyse, on connaît plus de 23 effecteurs intervenant dans sa régulation dont le plus puissant, en tout cas dans le foie de rat, est le fru-2,6-bP. Comme il stimule les apports énergétiques, il doit certainement intervenir dans l'osmorégulation.

Il existe des différences fonctionnelles entre les tissus branchiaux antérieurs et postérieurs, le premier ayant plutôt une fonction respiratoire, le second une fonction osmorégulatrice et les besoins énergétiques sont nécessairement plus importants dans les branchies postérieures. En effet, elles possèdent des pompes ioniques en quantité beaucoup plus importante (principalement  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATPase). Nous nous proposons donc de déterminer les taux de fru-2,6-bP existant dans les deux types de tissus branchiaux du crabe *Eriocheir Sinensis* comme signaux d'une glycolyse plus ou moins intense.

Une fois ces taux de fru-2,6-bP déterminés pour les deux tissus branchiaux, nous allons essayer de les moduler dans la branchie postérieure via une technique de perfusion en présence de substances telles que le dB AMPc "messenger secondaire" de la cellule activant la protéine kinase A responsable de la phosphorylation d'un grand nombre de protéines dont la PFK-2/FBPase (ce qui déclenche la synthèse du fru-2,6-bP) et l'O.A.G., substance mitogénique simulant l'effet du diacyl glycérol (DG) en activant la protéine kinase C qui phosphoryle elle-même, comme la kinase 1, la PFK-2/FBPase 2. En utilisant ces substances lors des perfusions branchiales, nous espérons vérifier l'effet activateur de l'AMPc et celui de l'O.A.G. sur le taux de fru-2,6-bP et, par la même occasion, suggérer qu'ils impliquent des changements d'activité enzymatique par phosphorylation.



# RESULTATS

**LISTE DES PRODUITS UTILISES**

Acide acétique glacial	UCB, 1005
Acide borique	Merck, 165
Acide chlorhydrique	Merck, 317
Acétate de magnésium	UCB, 1424
Aldolase	Sigma, A-6253
Chlorure de calcium	Merck, 2382
Chlorure de magnésium	Merck, 5833
Chlorure de potassium	Merck, 4936
Chlorure de sodium	Merck, 6404
Column PD-10 Séphadex G-25M	Pharmacia, 17-0851-01
Dithiothréitol-(DDT)	Janssen chimica, 16.568.78
Fructose-6-phosphate	Sigma, F-3627
Fructose-2,6-bisphosphate	Sigma, F-7006
Fructose-6-phosphate kinase pyrophosphate dépendant	Sigma, F-2258
Glycocolle (acide amino-acétique)	UCB, 1011
Hepès, 99% [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine- éthane sulfonic acid]	Janssen chimica, 17.257.88
Hydroxyde de sodium (Na OH)	Merck, 6498
Meldola blue (8-diméthylamino-2,3-benzophenoxazine)	Sigma, D-8142
Microtitration multi-well plate	Flow Labs S.A.N.Y.76-307-05
Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)	Sigma, N-8129
N <sup>2</sup> ,2'-O-dibutyryladénosine 3',5'-cyclic monophosphate	Sigma, D-0627
Oléil diacyl glycérol (OAG)	Sigma, O-6754
Pyrophosphate tétrasodium anhydre	Sigma, P-9146
SAB (albumine sérique bovine)	Merck, 12018
SDS (sodium dodécylsulfate)	Merck, 13760
Temed	Bio-rad, 161-800
TIM-GDH	Boehringer, 127-787
Tris ([Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane] acétane	Janssen chimica, 16.762.78;
	HAc, UCB, 1005
Tris / HCl	Janssen chimica, 16.762.78;
	HCl; Merck, A-317



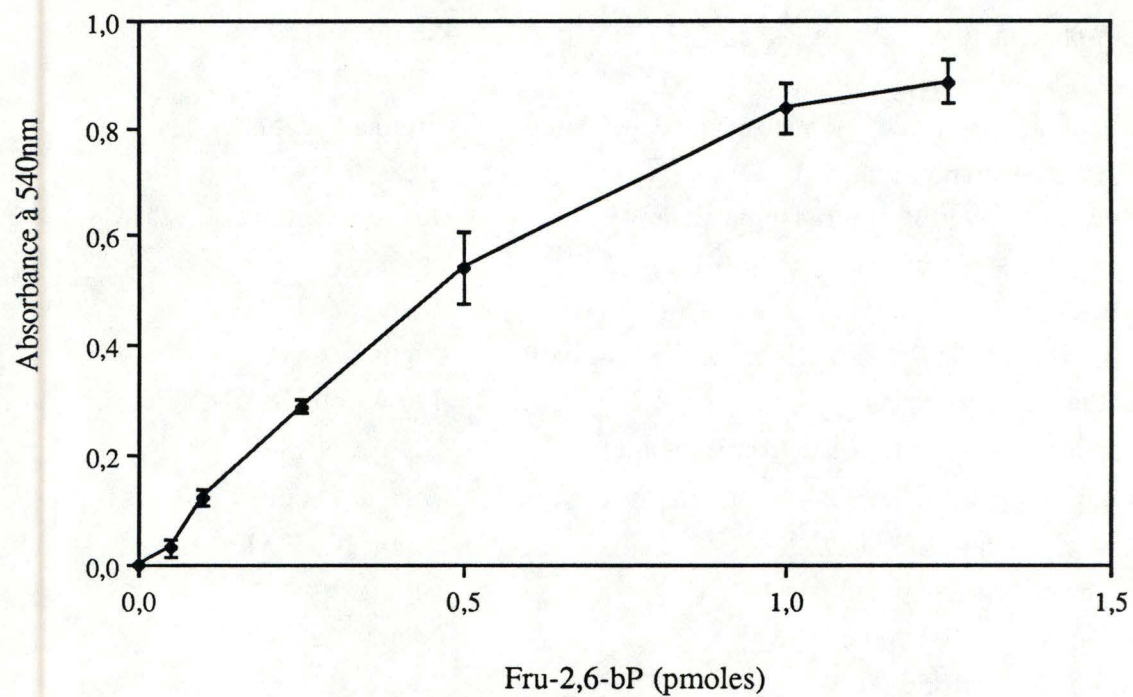


FIGURE 1 : Dosage du fru-2,6-bP à partir d'une solution étalon. Chaque valeur est la moyenne de plusieurs dosages effectués sur une même solution  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM).

## CHAPITRE I. CONDITIONS DE DOSAGE DU FRU-2,6-bP

### 1. DROITE D'ETALONNAGE

La construction de cette droite a été réalisée à partir d'une solution de fru-2,6-bP de concentration connue. Elle permet de déterminer la concentration en fru-2,6-bP dans les deux types branchiaux du crabe *E. sinensis* acclimaté à l'eau douce. Nous utilisons des quantités de fru-2,6-bP comprises entre 0,05 et 1,25 pmoles. Dans l'exemple présenté à la fig. 1, la zone de linéarité est comprise entre 0,05 et 0,5 pmoles de fru-2,6-bP; en dehors de cet intervalle, l'absorbance n'est plus proportionnelle à la concentration en fru-2,6-bP.

### 2. VERIFICATIONS CONCERNANT LA VALIDITE DU TEST

#### 2.1. DOSAGE D'UN EXTRAIT BRANCHIAL SANS FRU-6P

Le fru-6-P sert de substrat à la P<sub>Pi</sub>-PFK et sa concentration dans le test est calculée de façon à ce qu'on se trouve dans la zone où l'activité de l'enzyme est fonction linéaire de celle-ci. Or du fru-6-P peut se trouver dans l'échantillon utilisé pour la mesure du fru-2,6-bP. Dans ce type de contrôle, nous n'ajoutons pas de fru-6-P. De plus, au cours de l'extraction du fru-2,6-bP à partir du tissu branchial, nous chauffons l'homogénat à 80°C pendant 5 minutes, cette étape servant à faire disparaître le fru-6-P endogène. Ceci permet d'obtenir un surnageant contenant le fru-2,6-bP mais totalement dépourvu de fru-6-P.

Réaction où intervient le fru-6-P :

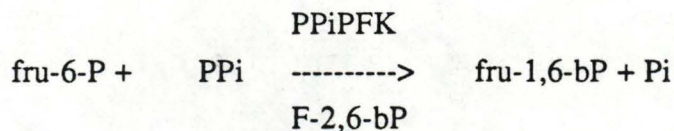




TABLEAU 1 : Tableau des résultats suite à l'élimination du fru-6-P

dilution de l'extrait de BA	Abs. à 540 nm
2 x	0.000
3 x	0.000
4 x	0.000
5 x	0.000
8 x	0.000

Ce genre d'expérience nous permet de dire que le fru-6-P de l'échantillon à mesurer est totalement détruit par chauffage. La concentration endogène étant devenue nulle, celle-ci n'interférera pas avec la concentration en fru-6-P ajoutée au test.

## 2.2. CONTROLE AVEC ET SANS PPI

Le "blanc" utilisé normalement consiste à remplacer le fru-2,6-bP par de l'eau bidistillée. Dans ce cas, les valeurs d'absorbance obtenues sont parfois supérieures à celles attendues, ce qui nous a amené à penser que certains effecteurs comme des ions par exemple, agiraient en stimulant la PPK-1, ce qui aurait pour conséquence l'oxydation d'une plus grande quantité de NADH. Pour essayer de mettre en évidence ce ou ces activateurs, nous avons effectué le dosage sans pyrophosphate, ce qui constitue un "vrai blanc". Comme l'activité de la PPI-PFK de plante est dépendante du pyrophosphate, l'omission de ce dernier doit empêcher toute activité de la PPI-PFK en absence de tout activateur ou stimulateur de cette PPI-PFK. Nous avons effectué le dosage et nous n'avons mesuré aucune absorbance dans ces conditions, ce qui nous permet de conclure qu'il n'y a pas d'effecteurs ou d'activateurs de la PPI-PFK qui interfèrent au cours du dosage.

## 2.3. STABILITÉ DU SIGNAL

La lecture au spectrophotomètre se fait de manière indirecte à 540 nm grâce à l'interaction d'un colorant (le Meldola blue) avec le NADH résiduel au cours d'une réaction d'oxydo-

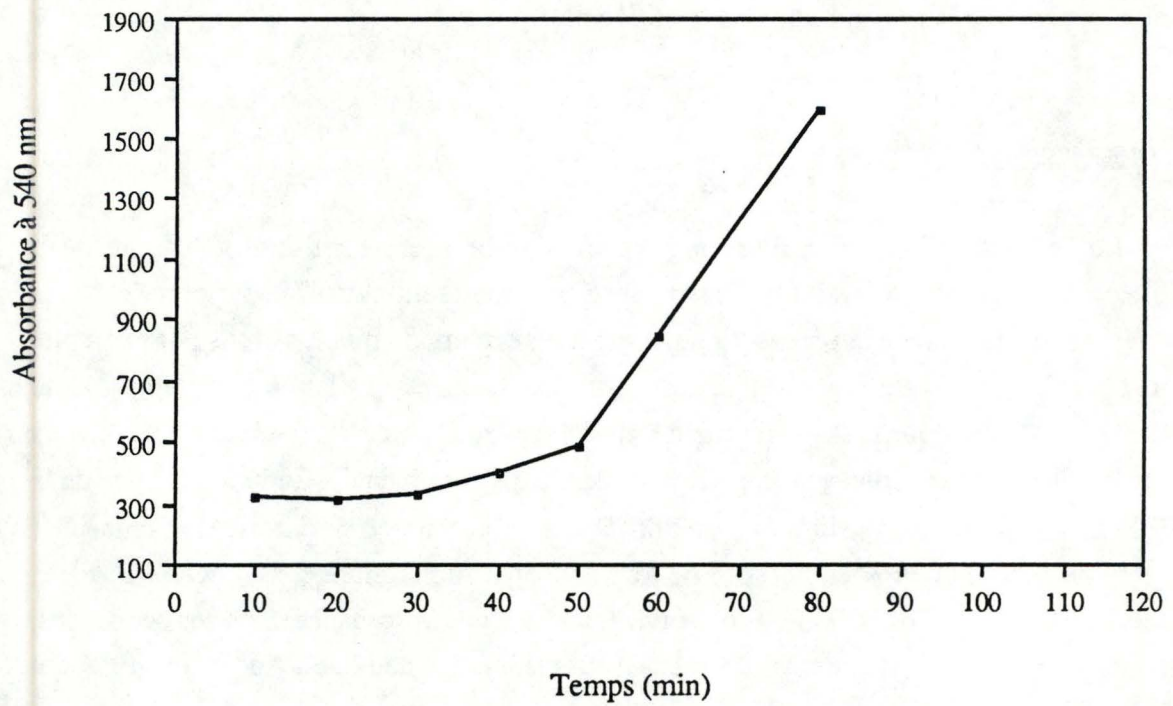
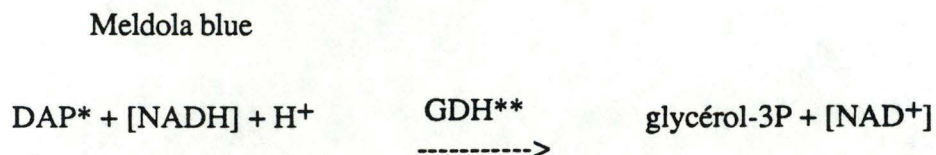


FIGURE 2 : Variation de l'absorbance au cours du temps pour une dilution de fru-2,6-bP de 0,5 picomole.



réduction de la réaction suivante :



\* : Dihydroxyacétone-P

\*\* : glycéraldéhyde déshydrogénase

Comme le montrent les résultats présentés dans le tableau ci-dessous, le signal obtenu grâce au Meldola blue n'est stable que durant 25 à 30 minutes. Passé ce délai, les valeurs d'absorbance augmentent très rapidement et n'ont plus rien à voir avec les concentrations en fru-2,6-bP présentes dans les tissus branchiaux. En fait, c'est le NADH présent dans le test qui est instable et qui se transforme complètement en NAD<sup>+</sup>.

TABLEAU 2

Temps (min) enregistrés 20' après l'arrêt de la réaction	Abs. lue à 540 nm pour 0,5 picomole de fru-2,6-bP
10	321
20	316
30	332
40	397
50	483
60	842
70	1596
80 et au-dessus	over (illisible)

N.B. : 0,5 picomole de fru-2,6-bP est la quantité choisie pour suivre la variation de l'absorbance au cours du temps.

On observe à la fois au tableau 2 et à la figure 2 qu'après 30 minutes, les valeurs d'absorbance augmentent rapidement et ne sont donc plus crédibles. Cela veut dire que la lecture au spectrophotomètre doit se faire à un temps fixe inférieur à 30 min. pour obtenir des résultats interprétables.

## CHAPITRE II. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LES DEUX TYPES DE BRANCHE D'ERIOCHEIR SINENSIS ACCLIMATE A L'EAU DOUCE

### 1. EFFET DU TRAITEMENT DU TISSU

Notre objectif est de mesurer la concentration en fru-2,6-bP dans les branchies antérieures et postérieures. Il est dès lors important d'être sûr que le traitement du tissu nécessaire pour isoler le fru-2,6-bP n'altère pas celui-ci. Pour cela, nous avons d'abord utilisé une quantité connue de fru-2,6-bP (soit 0,2 ml d'une solution 0,05  $\mu$ M) et nous l'avons mise exactement dans les mêmes conditions qu'un tissu branchial (homogénéisation dans 410  $\mu$ l de Na OH 50 mM). Le dosage du fru-2,6-bP a été réalisé sur 10  $\mu$ l de nos 610  $\mu$ l totaux. Le résultat obtenu pour cet étalon a été comparé à celui obtenu pour l'étalon non traité. Dans le cas de ce dernier, nous avons utilisé 10  $\mu$ l de la solution 0,05  $\mu$ M.

TABLEAU 3

Etalon	picomoles de fru-2,6-bP	
	valeurs calculées	valeurs observées
non-traité	0,50	0,51
traité	0,16	0,13

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que le fait de traiter l'étalon n'affecte pas la concentration en fru-2,6-bP. Nous obtenons des quantités de fru-2,6-bP attendues pour l'Etalon traité comme pour le non-traité; simplement le traitement de l'étalon a entraîné une dilution plus importante (3 x).

Ensuite, nous avons ajouté une quantité connue de fru-2,6-bP soit 10  $\mu$ l d'une solution 0,05  $\mu$ M (étalon interne) cette fois à un homogénat de branchie dont il fallait doser le contenu en fru-2,6-bP. L'objectif étant de calculer le taux de récupération après toute la phase préparative. La quantité totale de fru-2,6-bP contenue dans l'extrait tissulaire enrichi en étalon interne devrait être égale à celle de l'extrait de tissu plus celle de l'étalon interne seul.



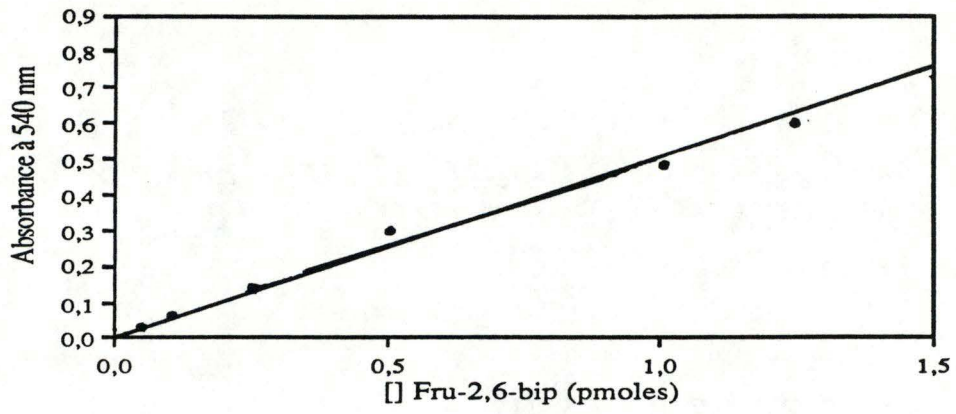


FIG. 3

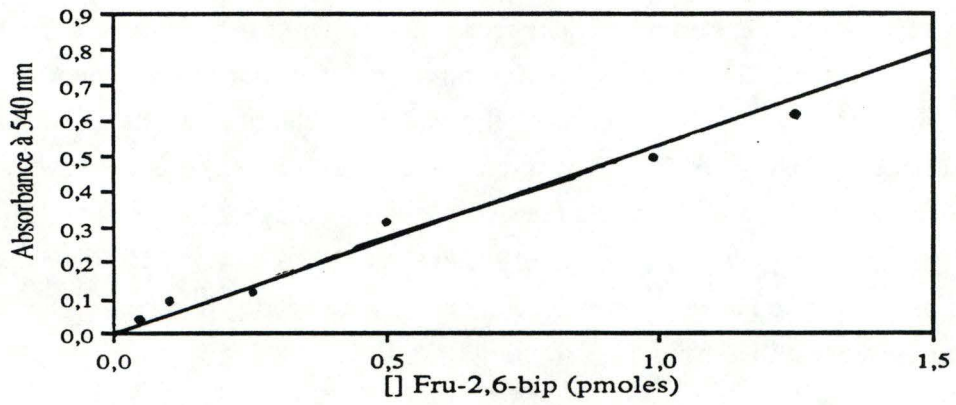


FIG. 4

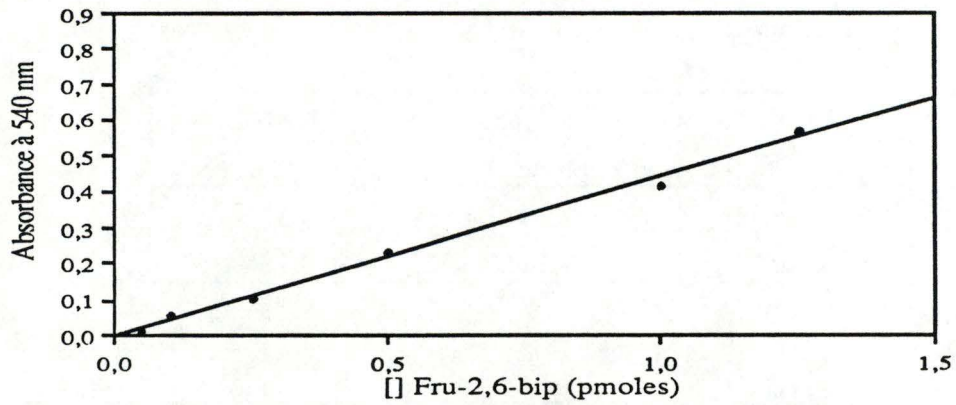


FIG. 5

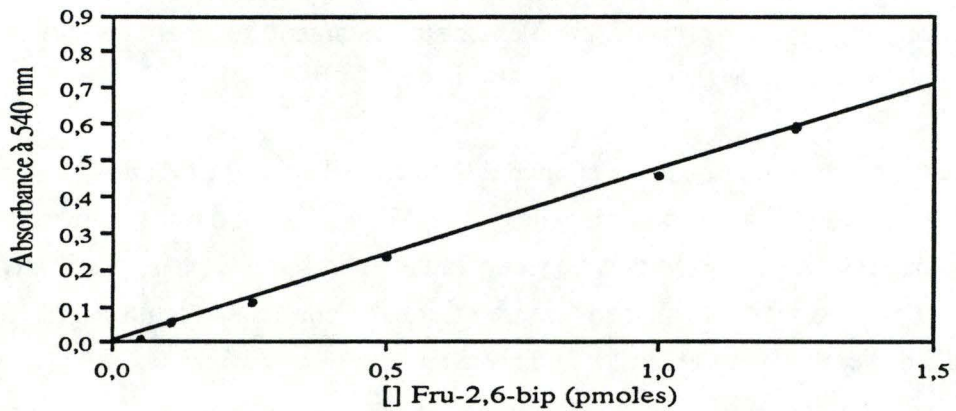


FIG. 6

FIGURES 3, 4, 5, 6 : Droites d'étalonnage permettant de déterminer la concentration en fru-2,6-bP présente dans différentes branchies antérieures.

TABLEAU 4

	picomoles de fru-2,6-bP
Etalon seul	0.25 / 5 $\mu$ l
Extrait de BP	0.47 / 5 $\mu$ l
Etalon + Extrait de BP	0.68 / 10 $\mu$ l

Au vu des résultats, ci-dessus le traitement du tissu branchial n'affecte pas le fru-2,6-bP qu'il contient. La valeur observée de 0.68 ne s'écarte que légèrement de la valeur calculée qui serait de 0.72.

En résumé, l'étude de l'effet du traitement sur la concentration en fru-2,6-bP ainsi que l'utilisation d'un étalon interne nous permettent de pouvoir déterminer la concentration en fru-2,6-bP présente dans les deux types branchiaux avec une relative confiance dans le test.

## 2. MESURE DU TAUX DE FRU-2,6-bP DANS LES BRANCHIES ANTERIEURES

Après avoir réalisé une courbe étalon et après avoir effectué les contrôles permettant d'être sûr qu'il n'y avait pas de perte de fru-2,6-bP ou que des effecteurs endogènes du tissu ne modifiaient pas la concentration en fru-2,6-bP, nous pouvons à présent doser le fru-2,6-bP dans les deux types branchiaux. Comme la zone de linéarité du dosage dépend de la qualité du colorant, nous avons réalisé pour chaque expérience une droite d'étalonnage. Celles-ci sont présentées dans la figure ci-contre.

Suite à ces droites d'étalonnage, nous présentons dans le tableau ci-dessous les concentrations de fru-2,6-bP obtenues pour différentes branchies antérieures. Chaque point représente la moyenne de quatres mesures.

TABLEAU 5

Branchies (mg)	Concentration en fru-2,6-bP (nmoles/g tissu)
75.5	1.07
68	1.06
56.3	0.35
54.8	0.37
$\bar{X}$ : 0.71nmoles/g; $\sigma$ : 0.35; $\sigma^2$ : 0.12	



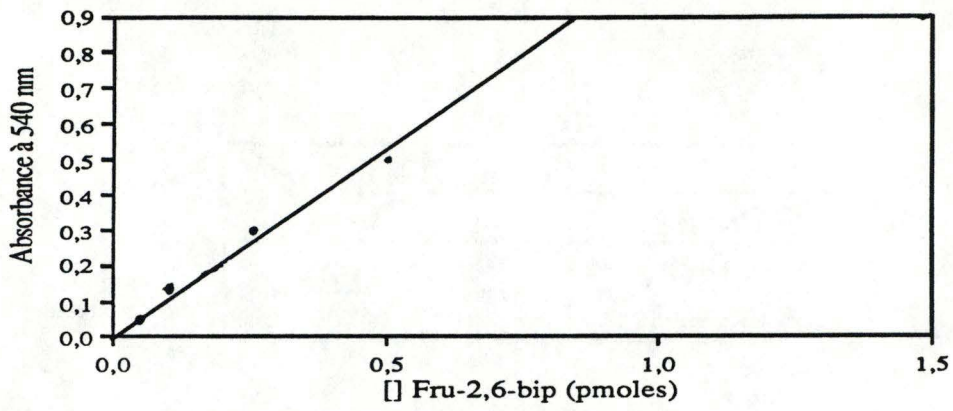


FIG. 7

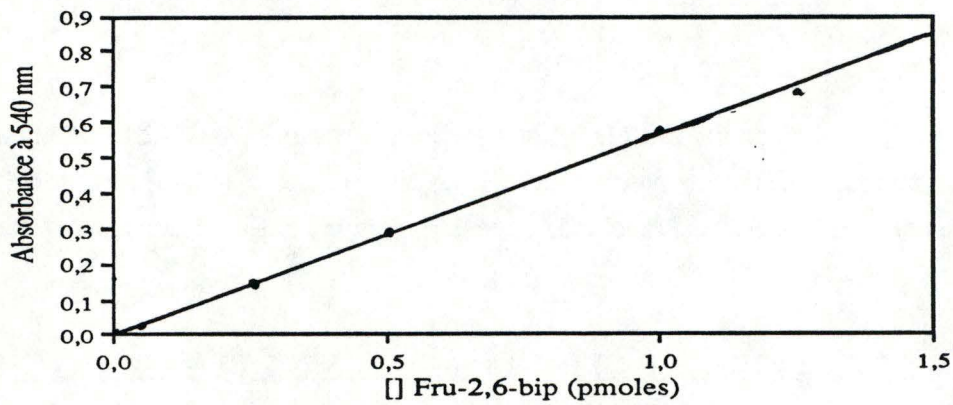


FIG. 8

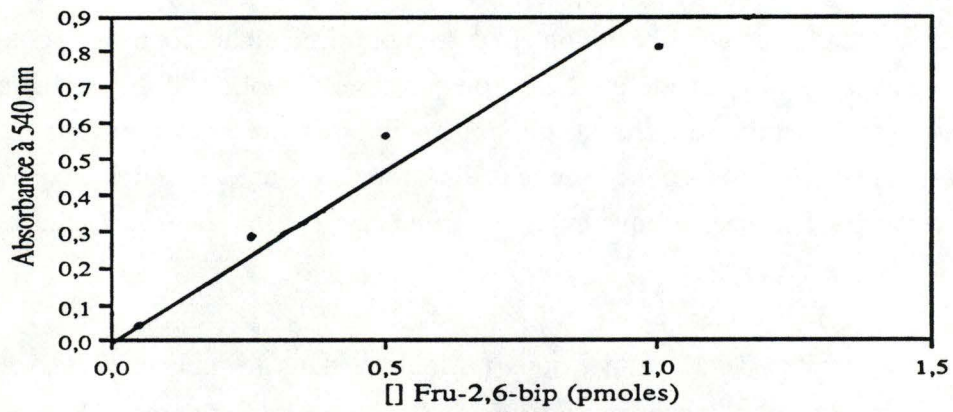


FIG. 9

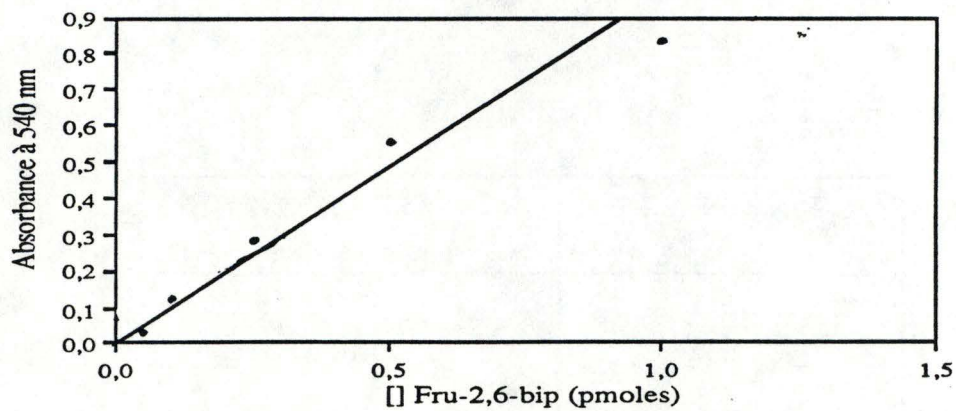


FIG. 10

FIGURES 7, 8, 9, 10 : Droites d'étalonnage permettant de déterminer la concentration en fru-2,6-bP présente dans différentes branchies postérieures.

### Discussion des résultats :

En regard des résultats repris dans le tableau ci-dessus, nous obtenons une concentration moyenne en fru-2,6-bP de 0.71  $\mu\text{M}$ . La comparaison des résultats individuels montre qu'il existe une grande variabilité du taux de fru-2,6-biP dans la population branchiale antérieure; variabilité que l'on tentera d'expliquer lorsque nous aurons les résultats des concentrations de fru-2,6-bP obtenues. Il faut noter ici que nous n'avons pas fait de différence entre variabilité à l'intérieur d'un animal avec celle observée d'un animal à l'autre.

### 3. MESURE DU TAUX DE FRU-2.6-bP DANS LES BRANCHIES POSTERIEURES

Après avoir déterminé la concentration en fru-2,6-bP dans les branchies antérieures, nous allons cette fois effectuer le dosage de fru-2,6-bP présent dans les branchies postérieures, ce qui nous permettra par la suite de comparer les taux dans les deux tissus branchiaux.

TABLEAU 6 : Tableau des résultats pour les branchies postérieures présentant les moyennes des concentrations en fru-2,6-bP.

Branchies (mg)	Concentration en fru-2,6-bP (nmoles/g tissu)
82.1	2.22
77.2	1.70
24.3	1.51
34.1	1.30
$\bar{X}$ : 1.68 nmoles/g; $\sigma$ : 0.34; $\sigma^2$ : 0.116	

Comme pour les branchies antérieures, nous avons effectué lors de chaque dosage une droite d'étalonnage. Celles-ci sont présentées ci-contre.

En regard des résultats repris dans le tableau, nous obtenons une concentration moyenne de fru-2,6-bP de 1.68  $\mu\text{M}$ , ce qui veut dire que le taux de fru-2,6-bP est supérieur dans les branchies postérieures par rapport aux branchies antérieures. La variabilité de la concentration en fru-2,6-bP dans la population branchiale postérieure n'est pas très différente de celle enregistrée dans la



population branchiale antérieure. Pourtant, nous pourrions nous attendre à une variabilité plus grande dans les branchies antérieures. En effet, comme l'ont montré Gilles et Pequeux (1981), un élément d'explication peut venir du fait que structurellement la branchie antérieure est différente de la branchie postérieure. En effet, cette première correspond à un tissu très lâche, les cellules possédant peu d'organites. L'existence de grands espaces fait que le tissu est très spongieux et fortement imbibé d'hémolymphe. Or avant d'homogénéiser la branchie, on la sèche pour mesurer son poids frais mais, comme on ne sait pas éliminer complètement l'hémolymphe se trouvant dans les espaces intercellulaires branchiaux, son poids sera soumis à une plus grande variabilité.

#### 4. COMPARAISON DES CONCENTRATIONS OBTENUES DANS LES BRANCHIES ANTERIEURES ET LES BRANCHIES POSTERIEURES

Le test de t va servir à déterminer si les concentrations moyennes des branchies antérieures et postérieures respectivement de  $0.72 \mu\text{M}$  et de  $1.7 \mu\text{M}$  sont significativement différentes.

$$H_0 : m_1 = m_2$$

$$H_1 : m_1 \neq m_2$$

si nous prenons un  $t_{0.975; 6} = 2.306$  SS

$$t_{0.995; 6} = 3.355 \text{ SS}$$

Le t théorique est de 3.418. Ceci nous permet de dire que nous rejettons l'hypothèse nulle et donc que les moyennes sont significativement différentes.

#### Commentaires :

Nous avons déjà remarqué auparavant qu'il existait des différences de type structural entre les branchies antérieures et postérieures, celles-ci étant dues à des différences fonctionnelles existant entre les deux types branchiaux. En effet, la branchie antérieure possède une membrane basale faisant très peu de replis (faible surface d'échange) et donc un espace relativement important occupé par l'hémolymphe. On a observé qu'une des fonctions principales de ce tissu doit être la respiration. Par contre, dans la branchie postérieure la membrane basale forme énormément de replis; ceci augmente la surface d'échanges entre le cytoplasme et le milieu extérieur. De plus, ces replis sont en contact direct avec un grand nombre de mitochondries. Or où il y a présence de beaucoup de mitochondries, il y a probablement un besoin accru d'énergie. En faisant une étude biochimique plus approfondie de la membrane, on a constaté qu'elle était le lieu d'action d'un grand nombre de pompes ioniques actives c'est-à-dire requérant de l'énergie. Ceci a permis de conclure que la branchie

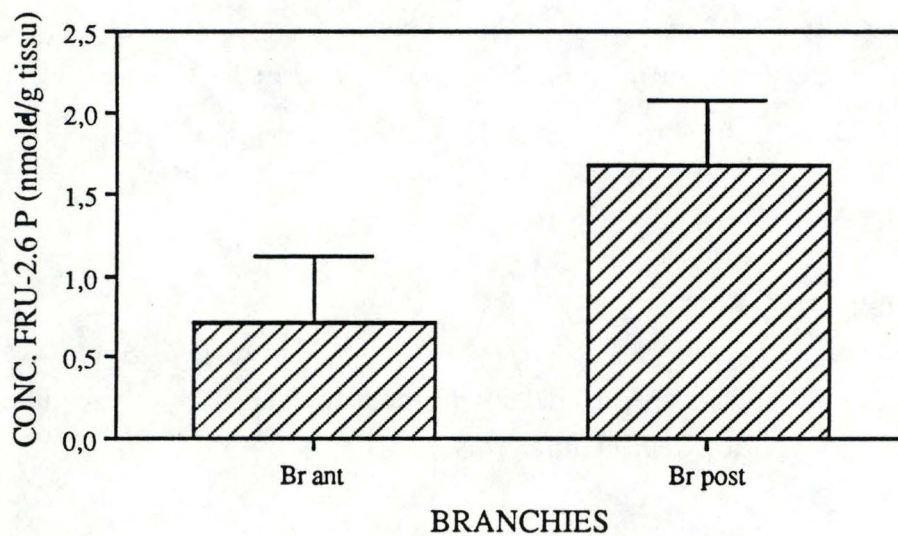


FIGURE 11 : Concentration en fru-2,6-bP dans les branchies antérieures et dans les branchies postérieures (n = 4). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 4 branchies  $\pm$  l'écart type.



postérieure du crabe *Eriocheir sinensis* était le siège principal de l'osmorégulation (Gilles et Pequeux, 1981).

Une telle énergie est produite principalement sous forme d'ATP qui est un des produits essentiels de la respiration cellulaire. Cette dernière se greffant sur la glycolyse, il faut donc au préalable activer celle-ci. Cela se fait entre autres par une stimulation plus importante d'une enzyme-clé de la glycolyse : la PFK-1. Or celui-ci est fortement activé par un effecteur très puissant : le fru-2,6-bP.

Le fait d'avoir une plus grande concentration en fru-2,6-bP dans les branchies postérieures est donc probablement lié au rôle osmorégulateur de ce tissu branchial. On peut donc comprendre qu'il y ait plus de fru-2,6-bP dans les branchies postérieures (fig. 11).

## CHAPITRE III. CONTROLE HORMONAL DE LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LES BRANCHIES POSTERIEURES D'ERIOCHEIR SINENSIS ACCLIMATE À L'EAU DOUCE

Le contrôle de la glycolyse est réalisé via l'intervention d'hormones telles l'insuline et le glucagon chez les mammifères. Chez les crustacés, le contrôle hormonal de la glycolyse se fait via des bioamines comme la dopamine ou la sérotonine. Le message qu'apportent ces bioamines est traduit intracellulairement par en AMPc ou GMPc, messagers secondaires intracellulaires. Ceux-ci peuvent activer des protéines kinases (A, C ou G) qui vont, à leur tour, phosphoryler de nombreuses protéines dont la PFK-2/FBPase-2 responsable de la synthèse et de la dégradation du fru-2,6-bP [55, 56]. La phosphorylation de cette PFK2/FBPase-2 va provoquer une augmentation de l'activité de la FBPase-2 et une diminution de l'activité de la PFK-2, cela favorisant la synthèse du fru-2,6-bP. Ceci nous amène à perfuser des branchies postérieures avec de dibutiryl-AMPc de manière à voir si son intervention est possible dans le contrôle du taux de fru-2,6-bP et par conséquent la vitesse de la glycolyse chez le crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

L'utilisation de branchies isolées et perfusées apporte plusieurs avantages :

- le contrôle de tous les paramètres extérieurs de la branchie par l'utilisation d'un liquide physiologique remplaçant l'hémolymphe
- la possibilité de perfuser avec toute une série d'effecteurs tels le DB-AMPc qui active la kinase A; l'OAG qui, comme le diacylglycérol, active la protéine kinase C.

### 1. EFFET DE LA PERFUSION SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP DANS LA BRANCHIE POSTERIEURE

Nous avons perfusé plusieurs branchies avec un liquide physiologique semblable à l'hémolymphe pendant environ une heure dans les conditions décrites dans la partie Matériel et Méthodes. Elles ont ensuite été congelées puis traitées comme décrit précédemment pour la mesure du fru-2,6-bP. N'ayant pas fait de cinétique dans le temps, nous ne pouvons rien dire quant à l'évolution de cette concentration au cours du temps. Le résultat des taux de fru-2,6-bP dans les branchies perfusées sont repris dans le tableau 7 ci-dessous et sont comparés aux taux de fru-2,6-bP dans des branchies non perfusées.. La figure 11 permet de comparer les



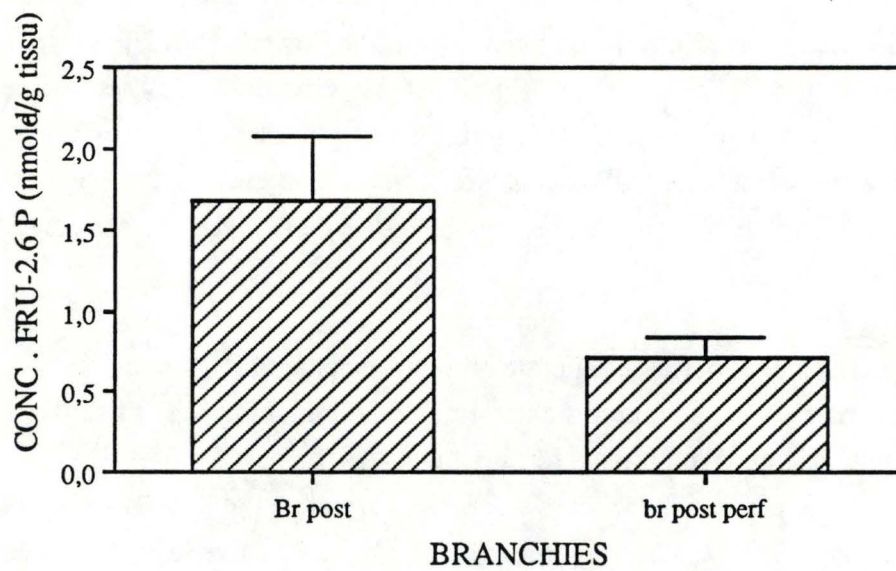


FIGURE 12 : Concentration en fru-2,6-bP dans les branchies postérieures non perfusées (n = 4) et dans les branchies postérieures perfusées. Les moyennes sont affectées de l'écart type ( $\sigma$ ).

moyennes de concentration en fru-2,6-bP. La figure 12 permet de comparer graphiquement les moyennes de concentration en fru-2,6-bP.

TABLEAU 7

BP non perfusées (nmoles/g)	BP perfusées (nmoles/g)
2.22	0.77
1.7	0.62
1.51	0.61
1.3	0.86
$\bar{x} = 1.68 \mu\text{M}$ $\sigma = 0.34; \sigma^2 = 0.116$	$\bar{x} = 0.715 \mu\text{M}$ $\sigma = 0.105; \sigma^2 = 0.011$

Nous utilisons ici un test d'ANOVA pour comparer les concentrations en fru-2,6-bP obtenues avec ou sans perfusion et ainsi de voir si les moyennes obtenues sont statistiquement différentes.

Nous utilisons le test d'ANOVA de type 1, avec un traitement à 2 niveaux :

BP perfs. : x2      BP non-perfus. : x1

Ho :  $m_1 = m_2$

H1 :  $m_1 \neq m_2$

Dans cette expérience, nous pouvons aussi rejeter l'hypothèse nulle et dire que la différence des moyennes enregistrée pour les branchies postérieures perfusées par rapport aux branchies non-perfusées est due à un effet non aléatoire (voir tableau des contrastes, group 1 vs. 2).

#### Discussion des résultats :

Nous ne pouvons actuellement expliquer la réduction de près de la moitié de la concentration en fru-2,6-bP lorsque l'on perfuse avec uniquement un liquide physiologique ressemblant à



l'hémolymphe. Voici les hypothèses que nous pouvons émettre à ce propos :

- 1) Cette réduction du taux de fru-2,6-bP pourrait signifier une glycolyse plus lente qui reflète peut-être un moins bon état du tissu branchial après une heure de perfusion.
- 2) La perfusion implique l'isolement du tissu branchial du reste des organes, ce qui peut provoquer un apport réduit de glucose nécessaire à la formation de F-6-P substrat indispensable à la formation du F-2,6-bP.
- 3) Une troisième hypothèse pourrait être une augmentation de l'activité de la FBPase-2 responsable de la dégradation du fru-2,6-bP nécessairement couplée à une diminution de l'activité de la PFK-2 responsable, elle, de la synthèse du fru-2,6-bP. Mais, pour le moment, les éléments d'explication restent hypothétiques.

## 2. EFFET DE LA PERFUSION AVEC DU DIBUTIRYL AMPc (150 $\mu$ M)

### 2.1. POURQUOI DU DIBUTYRIL AMPc

La membrane plasmique des branchies est essentiellement constituée de lipides hydrophobes imperméables aux molécules hydrophiles. L'AMPc ne peut donc traverser la membrane plasmique. Pour remédier à ce problème, on utilise un de ses dérivés plus hydrophobe, le dibutyryl AMPc qui, lui, peut traverser la membrane cellulaire.

### 2.2. POURQUOI PERFUSER AVEC DU AMPc

Cette molécule constitue un second messager intracellulaire où il se fixe sur l'unité régulatrice d'une protéine kinase (ici la kinase A), ce qui provoque la libération de l'unité catalytique de cette kinase qui peut alors phosphoryler un grand nombre de protéines dont la PPK-2/PBPase-2, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en fru-2,6-bP. Par ailleurs, Bianchini [79] a montré que l'AMPc active les pompes ( $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ ) responsables des flux de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  principalement. Le fait que cet AMPc active les pompes peut se remarquer via une variation de la différence de potentiel ( $D_{ddp}$ ). En effet, le fait d'activer les pompes va provoquer une augmentation du flux entrant de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  mais aussi une diminution du flux sortant de  $\text{Cl}^-$ . Dès lors, le potentiel à l'intérieur des cellules de la branchie postérieure devient de plus en plus négatif [36, 37, 79, 80].

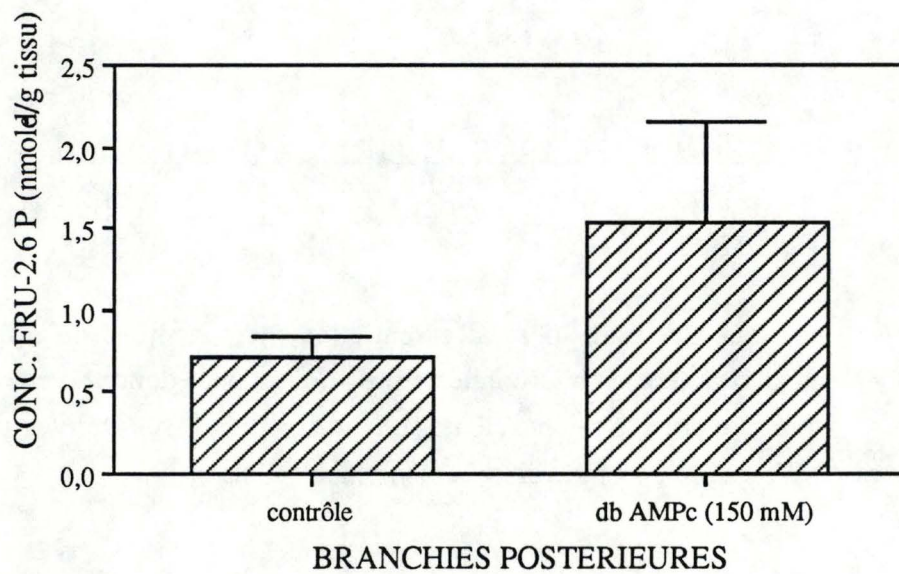


FIGURE 13 : Concentration en fru-2,6-bP dans les branchies postérieures perfusées avec le seul liquide physiologique (n = 4) et dans les branchies postérieures perfusées au DB AMPc (n = 3). Les moyennes sont affectées de l'écart type ( $\sigma$ ).



### 2.3. EFFET DU DB AMPc SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP

Nous avons perfusé des branchies postérieures pendant une heure, cette fois en présence de DB AMPc (150  $\mu$ M) : ces branchies ont été ensuite congelées et traitées comme décrit précédemment en vue de la mesure de la concentration en fru-2,6-bP. Les résultats sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous et dans la figure 13 ci-contre.

TABLEAU 8

BP contrôle (perfusées avec du liquide physiologique)		BP perfusées avec du DB AMPc (150 $\mu$ M)	
poids Br. (mg)	fru-2,6-bP (nmoles/g)	poids Br. (mg)	fru-2,6-bP (nmoles/g)
84	0.77	61	0.97
96	0.62	99	2.19
111	0.61	76	1.42
56	0.86		
$\bar{x} = 0.715; \sigma = 0.105; \sigma^2 = 0.011$		$\bar{x} = 1.52; \sigma = 0.5; \sigma^2 = 0.25$	

Nous avons aussi utilisé ici le test d'ANOVA de manière à déterminer si les différences de moyennes des concentrations de fru-2,6-bP entre les branchies postérieures "contrôle" (perfusées avec un liquide semblable à l'hémolymphe) et celles perfusées avec du DB AMPc sont significatives. Nous observons ici aussi une augmentation relativement importante de la concentration en fru-2,6-bP après action du DB AMPc, celle-ci est de fait statistiquement significative (voir tableau des contrastes; group 2 vs. 3).

#### Discussion des résultats :

Le fait qu'il y ait une tendance à l'augmentation de la concentration en fru-2,6-bP lorsque l'on perfuse la branchie avec du DB AMPc, et cela a été montré de manière statistique, et les arguments expérimentaux sont en faveur des explications décrites à la page précédente.

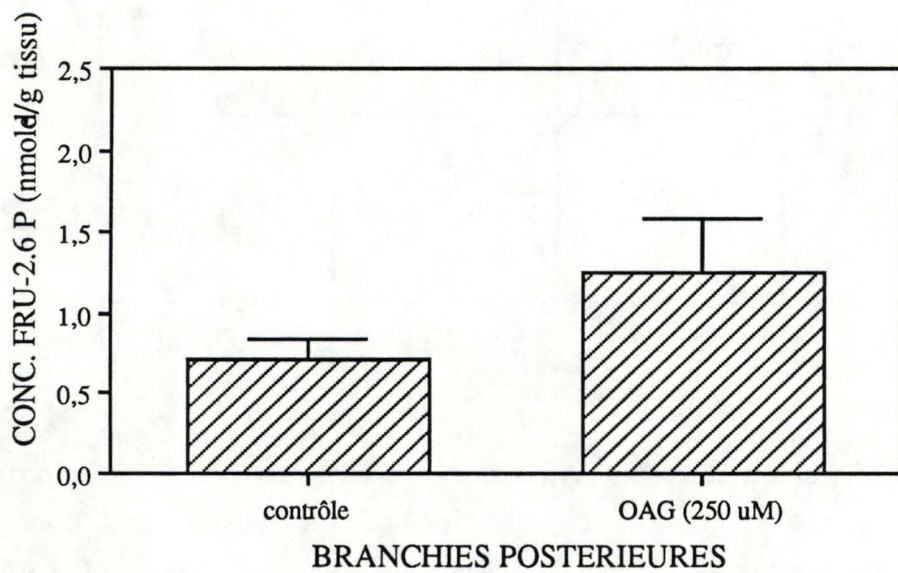


FIGURE 14 : Concentration en fru-2,6-bP dans les branchies postérieures "contrôle" (n = 4) et dans les branchies postérieures perfusées à l'O.A.G. (n = 3). Les moyennes sont affectées de l'écart type ( $\sigma$ ).



### 3. EFFET DE LA PERFUSION A L'OAG (OLEYL, DIACYL, GLYCEROL)

L'OAG, comme d'autres substances mitogènes, est connu entre autre pour augmenter le taux de fru-2,6-bP [77]. Comme dans l'expérience précédente, nous avons comparé les résultats obtenus pour des branchies postérieures perfusées en présence d'OAG avec ceux obtenus pour des branchies perfusées avec le seul liquide physiologique. Ces résultats sont présentés au tableau 9 ci-dessous et les moyennes sont représentées dans la figure 14 ci-contre.

TABLEAU 9

BP contrôle (perfusées avec du liquide physiologique)		BP perfusées avec de l'OAG (250 $\mu$ M)	
poids Br. (mg)	fru-2,6-bP (nmoles/g tissu)	poids Br. (mg)	fru-2,6-bP (nmoles/g tissu)
84	0.77	112	1.64
96	0.62	137	1.10
11	0.61	156	1.02
56	0.86		
$\bar{x} = 0.715; \sigma = 0.105; \sigma^2 = 0.011$		$\bar{x} = 1.265; \sigma = 0.075; \sigma^2 = 0.273$	

Le test de l'ANOVA nous a permis de dire que les différences de moyennes de concentration en fru-2,6-bP entre les branchies perfusées avec le liquide physiologique mimant l'hémolymphe et les branchies perfusées en présence d'OAG sont statistiquement significatives (voit tableau des contrastes, group 2 vs. 4).

#### Discussion des résultats :

L'OAG comme l'AMPc stimule les pompes ioniques, ce qui requiert de l'énergie et donc, comme décrit précédemment, une plus grande stimulation de la glycolyse via une plus grande activité d'un de ses enzyme-clefs : la PFK-1, ce qui peut être provoqué par une augmentation de la concentration en fru-2,6-bP présent dans la branchie.

L'OAG comme l'AMPc provoque directement une augmentation du taux de fru-2,6-bP mais ici non plus via la kinase A, mais par l'activation d'une protéine kinase C au même titre que le

TABLEAU 10 : Tableau des contrastes permettant de déterminer si les différences enregistrées entre les valeurs moyennes obtenues pour les branchies postérieures non perfusées (group 1), les branchies postérieures perfusées "contrôle" (group 2), les branchies postérieures perfusées au DB AMPc (group 3) et les branchies postérieures perfusées à l'OAG (group 4) sont statistiquement significatives.

One factor ANOVA X <sub>1</sub> : TRAITEMENT Y <sub>1</sub> : FRUCTOSE			
Comparison	Mean difference	Fisher PLSD	Scheffe F-test
Group 1 vs. 2	.968	.609*	4.172*
Group 1 vs. 3	.428	.658	.698
Group 1 vs.4	.156	.658	.093
Group 2 vs. 3	-.54	.658	1.114
Group 2 vs. 4	-.812	.658*	2.517

\* significant at 95%



diacylglycerol (DG). Cela provoque la translocation de la kinase C qui de cytosoluble et inactive devient membranaire et active, ce qui lui permet de phosphoryler un grand nombre de protéines dont la PFK-2/FBPase-2) avec pour résultat une synthèse plus importante de fru-2,6-bP [80].

## CHAPITRE IV. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

L'étude réalisée ici s'inscrit dans l'approfondissement de la compréhension du métabolisme énergétique du crabe *Eriocheir sinensis*. Nous nous sommes focalisés sur l'un des plus puissants activateurs de l'enzyme-clef de la glycolyse chez les vertébrés : le fru-2,6-bP, petit métabolite encore inconnu chez ceux-ci il y a une dizaine d'années et qui intervient d'une manière capitale dans la régulation de la PFK-1 et à travers elle sur le flux glycolytique et donc de la respiration cellulaire.

Nous avons été amené à nous intéresser au fru-2,6-bP au niveau des branchies. En effet, une des fonctions importantes de la branchie antérieure est la respiration; la fonction principale de la branchie postérieure est l'osmorégulation. Des études cytochimiques ont montré que la membrane plasmique de cette branchie postérieure forme une grande quantité de replis (grande surface d'échange) qui sont le lieu d'action des pompes ioniques (principalement  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase; GILLES et PEQUEUX, 1981). L'activité de ces pompes requérant un surplus d'énergie, nous avons pensé que le fru-2,6-bP, s'il existait chez le crabe *Eriocheir sinensis*, pourrait jouer ici aussi un rôle important dans la stimulation du flux glycolytique à travers la PFK-1.

Notre travail a consisté à doser les quantités de fru-2,6-bP présentes dans les branchies antérieures et postérieures avec comme idée maîtresse que ces quantités pouvaient être supérieures dans les branchies postérieures du fait de l'intervention privilégiée de celles-ci dans l'osmorégulation. Avant notre travail, on savait que le fru-2,6-bP était un puissant stimulateur de la PFK-1 chez les mammifères mais on ne l'avait jamais mis en évidence chez les crustacés. Ainsi notre travail a permis de vérifier l'existence du fru-2,6-bP dans les tissus branchiaux du crabe *Eriocheir sinensis* et de confirmer l'hypothèse qui vient d'être émise. Une fois que le dosage du fru-2,6-bP a été réalisé, nous avons cherché à moduler sa concentration par des substances telles l'AMPC et l'OAG qui augmentent l'activité des pompes ioniques responsables de l'osmorégulation et donc les besoins énergétiques.

Il a été montré dans l'introduction que le fru-2,6-bP était un régulateur puissant présent à tous les niveaux du monde vivant végétal et animal. L'aspect de son action qui a été abordé ici concerne le métabolisme énergétique de la branchie en association avec les adaptations osmotiques de la cellule. Afin de compléter cette étude, il serait utile d'étudier la régulation de la PFK-2/FBPase-2 responsable de la synthèse et de la dégradation du fru-2,6-bP et d'identifier de manière plus précise les effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) agissant sur cet enzyme. On pourrait se servir des perfusions branchiales pour voir l'action par exemple de certaines hormones comme la dopamine ou la sérotonine ou encore de substances comme la concavaline A, ou des ionophores spécifiques du calcium qui augmentent la concentration du fru-2,6-bP [55, 56].



# **BIBLIOGRAPHIE**

- [1] Lehninger biochimie. Chap. 13 : la glycolyse. Flammarion Médecine Sciences, p. 315, 316.
- [2] LIGOT X. (1988). Repérage immunologique d'une phosphofructokinase (PFK1) branchiale phosphorylable du crabe *Eriocheir sinensis*. Mémoire de Licence en Sciences Zoologiques, FUNDP.
- [3] STOREY K.B. (1985). New mechanisms in anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.*, 8, 439-461.
- [4] CAUVIN A. (1980). Effet de la température sur le métabolisme des hydrates de carbone chez le homard (*Homarus americanus* H. Milne Edwards) : rôle de la kinase du pyruvate dans la régulation de ce métabolisme. Mémoire de licence en Sciences Zoologiques, FUNDP.
- [5] BOULTON A.P. et HUGGINS A.K. (1970). Glycolytic activity in crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.*, 33, 491-498.
- [6] PERYLAR R.L., WANG C.H. et PRITCHARD A.W. (1965). Pathways of carbohydrate in the intermoult crayfish *Pacifascatus lenireculus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 14, 115-143.
- [7] Mc WHINNIE M.A. et KIRCHENBERG R.J. (1962). Crayfish hépatopancréas metabolism and the intermoult cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 6, 159-170.
- [8] Mc WHINNIE M.A. et CORKILL A.J. (1964). The hexosemonophosphate pathway and its variation in the intermoult cycle in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, P2, 81-93.
- [9] KALLAPUR V.I., RAMAMOHANRAO Y. et NARASUBHAI A.V. (1983). Glycolytic enzymes in the premolt field crab *Patatelphusa hydrodromus* (Milne-Edwards) crustacea. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 91, 127-132.
- [10] KRENTZER V., SIEGMUND B. et GRIESHABER K. (1985). Role of coupled substrates and alternative and products during hypoxia tolerance in marine invertebrates. *Mol. Physiol.*, 8, 371-392.
- [11] TRAUSH G. (1975). Etude de l'activité glycolytique chez un crustacé *Homarus vulgaris* Milne-Edwards. Thèse de doctorat en Sciences Chimiques.
- [12] THABREW M.I., POAT P.C. et MUNDAY K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B, 531-541.
- [13] VAN SCHAFTINGEN E. (1986). Fructose-2,6-bP / *Advances in Enzymology*, 59, 315-395.
- [14] VAN SCHAFTINGEN E. (1984). *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Bergmeyer H. et al, Verlag chimie, 7, 335-341 (3ème édition).



- [15] VAN SCHAFTINGEN E. (1986). Purification and properties of phosphofructokinase 2 / fructose 2,6-biphosphatase from chicken liver and from pigeon muscle. *Eur. J. Biochem.*, 159, 359-365.
- [16] ASSELBOURG V. (1989). La protéine kinase C et le transport ionique chez les crabes *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards). Mémoire de licence en Sciences Zoologiques.
- [17] KITAMURA K., UYEDA K., KANGAWA K. et MATSUO H. (1989). Purification and characterization of rat skeletal muscle. Fructose-6-Phosphate, 2-kinase : Fructose-2,6-biphosphatase. Vol. 264, n° 17, Issue of June 15, pp. 9799-9806.
- [18] ENEMOTO T. et al. (1989). Occurrence and characterization of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B (3), 477-480.
- [19] KRETSCHMER M et al (1987). Fructose-2,6-biphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase are separable in yeast. *Biochem. J.*, 246, 755-759.
- [20] UYEDA K. (1979). Phosphofructokinase. *Adv. Enz.*, 48, 193-244.
- [21] RAMAIDHA A. (1974). Pasteur effect and phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 8, 297-345.
- [22] VAN SCHAFTINGEN E. (1985). Fructose 2,6-biphosphate. Thèse d'aggrégation de l'Enseignement Supérieur, UCL.
- [23] STRYER L. (1981). *Biochemistry*. Chap. 12 : Glycolysis. Ed. Freeman W.H. and company, San Francisco, 2nd ed., 255-282.
- [24] SOLS A., CASTANO J.G., ARAGON J.J., DEMENECH et al (1981). Multimodulation of phosphofructokinase in metabolic regulation. In "Metabolic interconversion of enzymes", Ed. Holzer, Berlin, pp. 111-123.
- [25] STOREY K.B. (1983). Regulation of cockroach flight muscle phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate. Role in the activation of muscle metabolism during flight. *FEBS Lett.*, 161, 265-268.
- [26] STOREY K.B. (1985). Phosphofructokinase from flight muscle of the cockroach, *Periplaneta americana*. Control of enzyme activation during flight. *Insect. Biochem.*, 15, 663-666.
- [27] WEGENER G., BEINHAEUER I., KLEE A. et NEWSHOLME E.A. (1987). Properties of locust muscle 6-phosphofructokinase and their importance in the regulation of glycolytic flux during prolonged flight. *J. Comp. Physiol. B.*, 157, 315-326.
- [28] LESICHI A. (1980). The regulation of phosphofructokinase activity in hepatopancreas and abdominal muscle of crayfish *Orconectes Limosus raf* (*Crustacea decapoda*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 66B, 291-296.



- [29] POORMAN R.A., RANDOLPH A., WEMP R.G. et HEINRIKSON R.L. (1984). Evolution of phosphofructokinase-gene duplication of new effector sites. *Nature*, 309, 467-468.
- [30] AGUILAR Z. et URBINA J.A. (1986). The phosphofructokinase of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* : purification and kinatic mechanism. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 21, 103-111.
- [31] HOFU H.W. (1985). Phosphorylation of phosphofructokinase. The possible role of covalent modification in the regulation of glycolysis. In "Regulation of carbohydrate metabolism", Ed. Beitner R., 1, chap. 5, CRC Press Florida.
- [32] OROSZ F., CHRISTOVA T.Y. et OVADI J. (1988). Functional *in vitro* of calmodulin antagonist : effect of drugs on interactions between calmodulin and glycolytic enzymes. *Mol. Pharmacol.*, 33, 678-682.
- [33] SALE E.M., WHITE M.F. et WAHN R. (1987). Phosphorylation of glycolytic and glucogenesis enzymes by insulin receptor kinase. *J. Cell. Biochem.*, 33, 15-26.
- [34] PROBST I. et FECHNER K. (1985). Activation of glycolysis by insulin with a sequential increase of the 6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-biphosphate level and pyruvate kinase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem.*, 153, 347-353.
- [35] KUUCIJINA M. et UYEDA K. (1982). The tissue distribution of fructose-2,6-biP and fructose-6-P, 2-kinase in rats and the effect of starvation diabetes and hypoglycemia on hepatic fructose-2,6-P<sub>2</sub> and fructose-6-P, 2-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 104 (1), 84.
- [36] FRANCOIS J., ERASO P. et GANCEDO C. (1987) Changes in the concentration of CAMP, fructose-2,6-biphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *Biochem.*, 164, 369-373.
- [37] KITAMURA K., KANGAWA K., MATSUO H. et UYEDA K. (1988). Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate, 2-kinase : fructose-2,6-bisphosphatase by CAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biol. Chem.*, 263 (32), 16796-16801.
- [38] CLAUS T.H., EL-MAGHRABI M.R., REGEN D.M., STEWART H.B. et al (1984). The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. Department of Physiology, Vanderbilt University School of Medecine.
- [39] STITT M. et VASELLA A. (1988). Biological action of phosphonate analogs of fructose-2,6-bisphosphate on enzymes from higher plants. *Biochem.*, 228 (1), 60-64.
- [40] WALSH P.A., PALACIN M. et WATZ J. (1988). The zonation of liver and the distribution of fructose-2,6-bisphosphate in the rat liver. *Biol. Chem.*, 263 (10), 4876-4881.



- [41] FRANCOIS J., VAN SCHAFTINGEN E. et HERS H.G. Characterization of phosphofructokinase 2 and of enzymes involved in the degradation of fructose 2,6-bisphosphate in yeast.
- [42] LARONDELLE Y., MERTENS E., VAN SCHAFTINGEN E. et HERS H.G. (1989). Fructose 2,6-bisphosphate hydrolysing enzymes in higher plants. *Plant Physiol.*, 96, 827-834.
- [43] MERTENS E., VAN SCHAFTINGEN E. et HERS H.G. (1987). Fructose 2,6-bisphosphate and the control of the energy charge in higher plants. *Chimie Physiologie*, 221 (1), 124-128.
- [44] SALE E.M. et DENTON R.M. (1985).  $\beta$ -adrenergic agents increase the phosphorylation of phosphofructokinase in isolated rat epididymal white adipose tissue. *Biochem. J.*, 232, 905-910.
- [45] MANTEL L.H. et FARMER L.L. (1983). Osmotic and ionic regulation. In "The biology of crustacea", Ed. Mantel L.H., Academic Press, 5, Chap. 2, 54-143.
- [46] PEQUEUX A.J.R. et GILLES R. (1984). Control of extracellular fluid - Osmolality in crustaceans. In "Lecture notes on coastal and estuaire studies. 9. Osmoregulation in estuaire and marine animals", Ed. Pequeux A, GILLES R. et BOLIS L., springer-verlag Berlin, Heildeberg, New York, Tokyo.
- [47] WHEATLY M.J. (1985). The role of the antennal gland in ion and acid-base regulation during hyposaline exposure of the Dungenen crab cancer magister (Dana). *J. Comp. Physiol.*, 155B, 445-454.
- [48] WANSON S., PEQUEUX A. et LERAY C. (1983). Effect of salinity changes on adrenergic energy charge in gills of two euryhaline crabs. *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, 91 (2), B81-B82.
- [49] KELLER R. et ANDREW E.M. (1973). The sites of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocr.*, 20, 572-578.
- [50] SPINDLER K., WILLIG A. et KELLER K. (1975). Cyclic nucleotides and crustacean blood glucose level. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54, 301-304.
- [51] KELLER R. et SELDMEIER D. (1978). Hyperglycemic hormones in crustaceans. In "Comparative endocrinology", Eds. Gaillard P.J., Boers H.H., 437-446.
- [52] HENAULT J.P.E. et PROUX J.P. (1987). Cyclic AMP : the second messenger of an antidiuretic hormone from the glandular lobes of the migratory locust corpora cardiaca. *J. Insect. Physiol.*, 33, 487-491.
- [53] RENARD C. (1980). Influence de l'injection de bioamines sur la glycémie d'un crustacé décapode macrane *Homarus americanus* (H. Milne Edwards). Mémoire de Licence en Sciences Zoologiques, FUNDP.
- [54] SCHEIDE J.I. et DIETZ T.H. (1986). Serotonin regulation of gill CAMP production  $\text{Na}^+$  and water uptake in freshwater mussels. *J. Exp. Zool.*, 240, 309-314.



- [55] SCHEIDE J.I. et DIETZ T.H. (1983). Serotonin-stimulated adenylate cyclase in the gill of freshwater mussel and its relationship to sodium transport. *Physiol. Zool.*, 56 (4), 585-596.
- [56] SCHEIDE J.I. et DIETZ T.H. The effects of the calcium on serotonin-stimulated adenylate cyclase in freshwater mussels. *Bio. Bull.*, 166, 594-607.
- [57] STOMMEL E.W. et STEPHENS R.E. (1985). Cyclic AMP and calcium in the differential control of *Mytilus* gill cilia. *J. Comp. Physiol. A.*, 157, 451-459.
- [58] SOLEDAD G., CUENLLAS E. et RUIZ-AMIL M. (1990). Role of phosphofructokinase during trout haemopoiesis physiological regulation of glycolysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B (4), 705-710.
- [59] GOY M.F., SCHWARZ T.L. et KRAVITZ E.A. (1984). Serotonin-induced protein phosphorylation in a lobster neuromuscular preparation. *J. Neurosci.*, 4, 611-626.
- [60] EL-MAGHARABI M.R., CLAUS T.H., PILKIS J., FOX E. et PILKIS S.J. (1982b). *J. Biol. Chem.*, 257, 7603-7607.
- [61] HUE L. (1981). *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 52, 247-331.
- [62] KAGIMOTO T. et UYEDA K. (1979). *J. Biol. Chem.*, 254, 5584-5587.
- [63] KAGIMOTO T. et UYEDA K. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.*, 203, 792-799.
- [64] KATZ J. et ROGNSTAD R. (1976). *Curr. Top. Cell. Regul.*, 10, 237-289.
- [65] KOUNTZ P.D., EL-MAGHARABI M.R. et PILKIS S.J. (1985). *Arch. Biophys.*, 238, 531-543.
- [66] MIYATAKE K., KURAMOTO Y. et WITAOKA S. (1984a). *Biochem. Biophys. Res. comm.*, 122, 906-911.
- [67] REYES A., HUBERT E. et SLEBE J.C. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 127, 373-379.
- [68] RIDER M.H. et HUE L. (1985). *Biochem. J.*, 225, 421-428.
- [69] VAN SCHAFTINGEN E., HUE L. et HERS H.G. (1980a). *Biochem. J.*, 192, 263-271.
- [70] VAN SCHAFTINGEN E., HUE L. et HERS H.G. (1980b). *Biochem. J.*, 192, 887-895.
- [71] VAN SCHAFTINGEN E., JETT M.F., HUE L. et HERS H.G. (1981a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3483-3486.
- [72] VAN SCHAFTINGEN E., OPPERDOES F.R. et HERS H.G. (1985). *Eur. J. Biochem.*, 153, 403-406.
- [73] VAN SCHAFTINGEN E., COULIE P.G., VAN SNICK J. et HERS H.G. (1986). *Eur. J. Biochem.*, in press.
- [74] REEVES R.E. (1976). *Trends Biochem. Sci.*, 1, 53-55.
- [75] BAUCHAU A. (1966). *La vie des crabes*. Ed. Chevalier P., Paris.



- [76] HUE L., BLACKNORES P.F., SHIKAMA H., ROBINSON-STEINER A. et EXTON J.H. (1982). Regulation of fructose-2,6-biphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs. *J. Biol. Chem.*, 257 (8), 4308-4313.
- [77] BOSCA L., MOJENA M. et MARQUEZ C. (1988). Phorbol 12,13-dibutyrate and mitogens increase fructose 2,6-biphosphate in lymphocyte. *Biochem.*, 175, 317-323.
- [78] VASTA V., BRUNI P., VANNININ F. et FARNARARO M. Fructose 2,6-biphosphate and insulin stimulation of glycolysis in 3T3-Li Adipocytes.
- [79] BIANCHINI A. et GILLES R. (1989). Cyclic AMP as a modulator of NaCl transport in gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Marine Biol.*
- [80] BERRIDGE M. (1985). Les molécules de la communication dans la cellule. Pour la Science, 98, 134-146.
- [81] THRASHEC J.R., COOPER M.D. et DUNAWAY G.A. (1981). Developmental changes in heart and muscle phosphofructokinase isoenzymes. *J. Biol. Chem.*, 256, 7844-7848.
- [82] GILLIS R. et PEQUEUX A. (1983). Interactions of chemical and osmotic regulation with the environment. In : "The Biology of Crustacea", Eds Vernberg F.J. and Vernberg W.B. Academic Press, 8th ed., chap. 4, 109-177.
- [83] SOLS A. (1981). Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 19, 77-101.
- [84] KAMEMOTO E.S. et MANSOUR T.P. (1986). Phosphofructokinase in the fluke *Fasciola hepatica*. Purification and kinetic changes by phosphorylation.
- [85] KREBS E.G. (1985). The phosphorylation of proteins : a major mechanism for biological regulation. *Biochem. Soc. T.*, 13 (5), 813-820.
- [86] COHEN P. (1983). The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur. J. Biochim.*, 151, 439-448.
- [87] SPARK J.N. et BRAUTIGAN D.L. (1986). Molecular basis for substrate specificity of protein kinase and phosphatase. *Int. J. Biochem.*, 18, 497-504.
- [88] SALE E.M., WHITE M.F. et KAHN R. (1987). Phosphorylation of glycolytic and glucogenesis enzymes by insulin receptor kinase. *J. Cell. Biochem.*, 33, 15-26.
- [89] KITAJIMA S., SAKAKIBARA R. et UYEDA K. (1983). Significance of phosphorylation of phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, 258, 13292-13298.
- [90] SALE E.M. et DENTON R.M. (1985). Adipose-tissue phosphofructokinase. Rapid purification and regulation by phosphorylation *in vitro*. *Biochem. J.*, 232, 897-904.
- [91] LAGRANGE J.L., MARIE J., COTTREAU D., FISHER S. et KAHN A. (1980). Endogenous phosphorylation of soluble enzyme in human red cells, cyclic 3',5'-AMP-dependent phosphorylation of phosphofructokinase without detectable regulatory effect. *Biochim. Biophys. A.*, 612, 213-225.