



## THESIS / THÈSE

### LICENCE EN ZOOLOGIE

#### **Le Fructose-2,6-bisphosphate et les bioamines dans le transport ionique au niveau des branchies du crabe *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) acclimaté à l'eau douce**

Detaille, Dominique

*Award date:*  
1991

*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.

**Le Fructose-2,6-bisphosphate et les bioamines dans le transport ionique au niveau des branchies du crabe *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards) acclimaté à l'eau douce.**

DETAILLE Dominique

Résumé.

1. Les bioamines telles que la dopamine et la sérotonine agissent sur le transport ionique.  
\* La mesure de la différence de potentiel mettrait en évidence un effet sur la pompe  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasique et sur les canaux à  $\text{Cl}^-$  pour les branchies postérieures et sur la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasique pour les branchies antérieures.  
\* La mesure du flux de  $\text{Na}^{22+}$  en présence de dopamine met en évidence un effet activateur de cette bioamine sur le flux sortant de  $\text{Na}^+$  du moins pour les branchies postérieures.
2. La perfusion de branchies antérieures et postérieures du crabe euryhalin *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce entraîne une diminution du fructose 2,6-bisphosphate et du rapport ATP/ADP. La présence de dopamine et de sérotonine dans le milieu "in" provoque une augmentation de fructose 2,6-bisphosphate identique dans les branchies antérieures et postérieures; le rapport ATP/ADP n'est pas modifié.
3. La perfusion de branchies antérieures et postérieures avec un milieu "sea water" induit également une diminution du fructose 2,6-bisphosphate et du rapport ATP/ADP : l'effet de la dopamine et de la sérotonine est identique à celui obtenu lorsque nous perfusions avec un milieu "fresh water". Les deux amines, en augmentant le fructose 2,6-bisphosphate, activeraient le "flux glycolytique" à partir des réserves énergétiques propres de la branchie ce qui pourrait confirmer que l'activité de transport ionique est essentiellement liée aux phosphorylations oxydatives plutôt qu'à la glycolyse.

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques

Juin 1991

Promoteur : P. Devos

Au terme de cette année, je tiens à remercier tout particulièrement le **Révérénd Père P. DEVOS**, promoteur de ce mémoire, pour avoir mis aimablement le laboratoire à ma disposition.

Je remercie Monsieur **G. TRAUSCH**, co-promoteur de ce mémoire, pour l'immense disponibilité dont il a fait preuve durant toute l'année.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame **Marie-Ange BENOIT** et à **Luc WELCOMME** pour les conseils et l'aide qu'ils m'ont apportés durant la réalisation de ce travail.

Je remercie les personnes du Département d'Endocrinologie qui, à tout moment, m'ont soutenu dans les travaux de laboratoire.

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

**INTRODUCTION.....1**

**CHAPITRE I OSMOREGULATION CHEZ LES CRUSTACES.**

1.Introduction.....1

2.La branchie comme organe osmorégulateur.....2

2.1 Aspects morphologiques.....2

2.2 Aspects physiologiques.....5

    a.les branchies antérieures.....8

    b.les branchies postérieures.....8

2.3 Conclusion:application du modèle d'"*Eriocheir sinensis* à d'autres crustacés.....11

3.Les bioamines et l'osmorégulation.....12

3.1 Introduction.....12

3.2 L'action hormonale chez les invertébrés.....14

    3.2.1 Invertébrés non arthropodes.....14

    3.2.2 Crustacés.....15

        A. L'hormone hyperglycémiant.....15

        B. Les bioamines et les nucléotides cycliques...15

3.3 Les bioamines et la transduction hormonale.....18

3.4 Conclusions.....21

**CHAPITRE II.LE TRANSPORT IONIQUE ET SON METABOLISME.....22**

1.Introduction.....22

2.Biochimie de la branchie.....22

    2.1.La Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase.....22

    2.2.Osmorégulation et métabolisme énergétique.....25

    2.3.Conclusions.....29

**CHAPITRE III.LE FRUCTOSE-2,6-BISPHOSHATE ET SON ROLE DANS LA REGULATION METABOLIQUE.....31**

1.Rappel de la glycolyse.....31

2.Importance du Fructose-2,6-bisphosphate.....32

3.Caractéristiques du Fru-2,6-bP.....33

4.Synthèse et dégradation du Fru-2,6-bP.....34

5.Rôle du Fru-2,6-bP dans la régulation métabolique.....35

    5.1 Dans le foie de rat.....35

    5.2 Chez les plantes.....37

    5.3 Dans la levure.....38

    5.4 Dans d'autres tissus.....38

        5.4.1 Les muscles striés.....38

5.4.2 Le tissu adipeux.....	39
5.4.3 Les tissus d'invertébrés non arthropodes.....	39
5.4.4 Le tissu branchial des crustacés.....	41
5.5 Conclusion:le Fru-2,6-bP,signal glycolytique.....	41
<b>Conclusions générales.....</b>	<b>43</b>
<b>CHAPITRE IV.ORIENTATION DU TRAVAIL.....</b>	<b>44</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>46</b>
<b>CHAPITRE I.MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>46</b>
1.Intérêt des recherches sur les crustacés.....	46
2.Description de l'animal et position systématique.....	47
3.Stabulation des animaux.....	47
<b>CHAPITRE II.PROCEDURES PREPARATOIRES. ....</b>	<b>48</b>
1.Prélèvement des branchies.....	48
2.Traitement du tissu branchial.....	48
2.1. Pour le dosage du fructose-2,6-bisphosphate.....	48
2.2. Pour le dosage de l'ATP et de l'ADP.....	49
<b>CHAPITRE III.TECHNIQUE DE PERFUSION DES BRANCHIES ET     MESURE D'UN FLUX IONIQUE.....</b>	<b>50</b>
1.Principe.....	50
2.Composition des solutions isotoniques.....	50
3.Mode opératoire.....	50
4.Mesure de la ddp(différence de potentiel).....	51
5.Mesure du flux entrant de <sup>22</sup> Na.....	52
<b>CHAPITRE IV.DOSAGE DU FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATE.....</b>	<b>53</b>
1.Principe.....	53
2.Réactifs et solutions.....	54
3.Mode opératoire.....	55
4.Conditions de dosage du Fru-2,6-bP.....	55
4.1.Courbe étalon et dilutions des échantillons.....	55
4.2.Effet du traitement du tissu.....	56
<b>CHAPITRE V.DOSAGE DE L'ATP ET DE L'ADP.....</b>	<b>58</b>
1.Principe.....	58
2.Produits et préparations.....	59

3. Mode opératoire.....	60
-------------------------	----

**RESULTATS.....62**

**CHAPITRE I. EFFET DE LA PERFUSION SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-BP ET SUR LE RAPPORT ATP/ADP DANS LES DEUX TYPES DE BRANCHIES DU CRABE CHINOIS ACCLIMATE A L'EAU DOUCE.....62**

1. Fructose-2,6-bisphosphate.....	62
-----------------------------------	----

2. Le rapport ATP/ADP.....	65
----------------------------	----

**CHAPITRE II. EFFET DES BIOAMINES SUR LA DDP TRANSEPTHE-LIALE, SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-BP ET SUR LE RAPPORT ATP/ADP.....67**

1. Introduction.....	67
----------------------	----

2. Effet de la sérotonine.....	68
--------------------------------	----

2.1 Action de cette bioamine sur la ddp.....	68
--	----

2.1.1 Au niveau des branchies postérieures.....	68
---	----

2.1.2 Au niveau des branchies antérieures.....	70
--	----

2.2 Action de la sérotonine sur la concentration en	
---	--

fructose-2,6-bisphosphate.....	72
--------------------------------	----

2.3 Action de la sérotonine sur le rapport ATP/ADP....	73
--	----

3. Effet de la dopamine.....	74
------------------------------	----

3.1 Action de cette bioamine sur la ddp.....	74
--	----

3.1.1 Au niveau des branchies postérieures.....	74
---	----

3.1.2 Au niveau des branchies antérieures.....	75
--	----

3.2 Action de la dopamine sur la concentration en	
---	--

fructose-2,6-bisphosphate.....	75
--------------------------------	----

3.3 Action de la dopamine sur le rapport ATP/ADP.....	76
---	----

4. Effet du dbAMPc.....	77
-------------------------	----

4.1 Effet de la perfusion avec du dbAMPc sur la ddp..	77
---	----

4.1.1 Au niveau des branchies postérieures.....	77
---	----

4.1.2 Au niveau des branchies antérieures.....	78
--	----

4.2 Effet du dbAMPc sur la concentration en	
---	--

fructose-2,6-bisphosphate.....	78
--------------------------------	----

4.3 Effet du dbAMPc sur le rapport ATP/ADP.....	79
---	----

5. Conclusions.....	80
---------------------	----

<b>CHAPITRE III. EFFET DE LA PERFUSION AVEC UN RINGER "EAU DE MER" ET INFLUENCE DE LA DOPAMINE ("SW") SUR L'ACTIVITE DE TRANSPORT, LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-BP ET SUR LE RAPPORT ATP/ADP AU NIVEAU DES BRANCHIES DU CRABE <i>ERIOCHEIR SINENSIS</i> ACCLIMATE A L'EAU DOUCE.....</b>	<b>83</b>
1. Introduction.....	83
2. Effet de la perfusion et rôle de la dopamine.....	84
2.1 Influence de la dopamine en "SW" sur la ddp.....	84
2.1.1 Au niveau des branchies postérieures.....	84
2.1.2 Au niveau des branchies antérieures.....	85
2.2 Effet de la perfusion sur la concentration en fructose-2,6-bisphosphate.....	86
2.2.1 Influence du Ringer "SW".....	86
2.2.2 Influence de la dopamine.....	87
2.3 Effet de la perfusion avec un Ringer "SW" sur le rapport ATP/ADP.....	88
2.3.1 Influence du Ringer seul.....	88
2.3.2 Influence de la dopamine.....	89
<b>CHAPITRE IV. INFLUENCE DES BIOAMINES SUR LES FLUX IONIQUES.</b>	<b>90</b>
1. Introduction.....	90
2. Mesure du flux entrant de $^{22}\text{Na}$ sous l'effet de la dopamine dans les BP perfusées avec un Ringer "FW"...	90
<b>CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>92</b>



THE UNIVERSITY OF CHICAGO  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
RESEARCH REPORT NO. 1000  
BY  
J. H. GOLDSTEIN AND  
R. F. W. WILSON  
PUBLISHED BY THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS  
CHICAGO, ILLINOIS  
1955

## LISTE DES ABREVIATIONS.

ADP	Adénosine-5'-diphosphate
ALD	Aldolase
AMP	Adénosine-5'-monophosphate
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
A.E.C	"Adenylate energy charge"
BA	Branchies Antérieures
BP	Branchies Postérieures
DAP	Dihydroxyacétone phosphate
dbAMPc	Dibutyryl adénosine monophosphate cyclique
Ddp(ou P.D.)	Différence de potentiel transépithéliale
Et.	Etalon(s)
Fru-2,6-bP	Fructose-2,6-bisphosphate
Fru-6-P	Fructose-6-phosphate
FBPase-1	Fructose-1,6-bisphosphatase
FBPase-2	Fructose-2,6-bisphosphatase
FW	"Fresh water" (Ringer "Eau douce")
g	gramme
x g	x la gravitation
GAD	D-glyceraldéhyde-3-phosphate
G-6-P	Glucose-6-phosphate
GDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
kD	Kilodaltons
mM	millimolaire
$\mu$ M	micromolaire
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide(f.réduite)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide(f.oxydée)
nm	nanomètre
PFK	Phosphofructokinase(des tubercules de pomme de terre)
PFK-1	Phosphofructokinase-1
PFK-2	Phosphofructokinase-2
PPi-PFK	Phosphofructokinase dépendant du pyrophosph.
rpm	Rotations par minute
SW	"Sea water" (Ringer "Eau de mer")

# INTRODUCTION

# CHAPITRE I

## OSMOREGULATION CHEZ LES CRUSTACES.

### 1. INTRODUCTION.

La plupart des crustacés marins sont "osmoconformes"; ils ont la particularité de posséder des mécanismes de régulation osmotique et ionique très variés:

- certains sont dits sténohalins: ils tolèrent généralement une gamme restreinte de dilutions du milieu extérieur.

- d'autres sont euryhalins: ils peuvent supporter de larges variations de salinité du milieu extérieur.

Le contrôle de l'osmolalité de l'hémolymphe des crustacés est essentiellement lié à celui des mouvements ioniques. Cette régulation implique notamment des transports actifs et passifs du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  entre le milieu extérieur, le milieu intracellulaire et l'hémolymphe.

Le maintien d'un état d'équilibre "steady state" concernant la composition des fluides internes en fonction de la salinité du milieu extérieur implique deux principales catégories de mécanismes:

\* des mécanismes limitants dont le but est de diminuer les pertes dues à la diffusion, soit en réduisant les gradients qui engendrent les flux passifs, soit en agissant sur les propriétés de perméabilité des structures épithéliales ou en réduisant la surface d'échange.

\* des mécanismes compensatoires consommant l'énergie et qui produisent des contre-mouvements de solutés égaux en importance à la diffusion (perte ou gain) [Mantel, L.H et Farmer, L., 1983].

L'hyper- ou l'hypoosmolarité observées, pour l'hémolymphe vis-à-vis du milieu extérieur, viennent de phénomènes de charge ou de décharge d'ions inorganiques, contrôlés par des mécanismes actifs et passifs au niveau d'épithélia spécialisés.

Le moyen le plus direct de réduire la diffusion de l'eau et des ions est de diminuer la concentration ionique de l'hémolymphe et par conséquent, le gradient osmotique entre le sang et le milieu extérieur. Les animaux présentant ce genre de régulation sont dénommés osmoconformes. Certaines espèces de crustacés ont donc ainsi développé des mécanismes de régulation hyperosmotique leur permettant de maintenir des concentrations ioniques de l'hémolymphe supérieures à celles d'un environnement dilué. Sous ces conditions, les animaux réduisent la perméabilité à l'eau et aux ions au niveau de leur surface corporelle et augmentent la prise de sels au niveau de structures épithéliales spécialement conçues à cet effet.

On retrouve des cellules épithéliales spécifiques dans la paroi du tube digestif et dans les organes rénaux, mais l'action de celles-ci semble insuffisante pour expliquer l'osmorégulation de l'hémolymphe. Les branchies apparaissent être le tissu le plus apte à remplir cette fonction osmorégulatoire indispensable à l'homéostasie des crustacés. [Mantel, L.H et Farmer, L., 1983]

## 2. LA BRANCHIE COMME ORGANE OSMOREGULATEUR.

L'épithélium branchial représente donc une des structures spécialisées où s'effectue l'entrée active compensatrice de NaCl.

### 2.1 Aspects morphologiques

Depuis les expériences de Koch (1954), la fixation des tissus au nitrate d'argent est utilisée pour localiser les régions de la cuticule des arthropodes qui sont perméables aux ions  $Cl^-$  et donc susceptibles d'être impliquées dans les mouvements ioniques. Cette technique, adaptée aux crustacés, a permis l'identification de l'épithélium branchial comme le

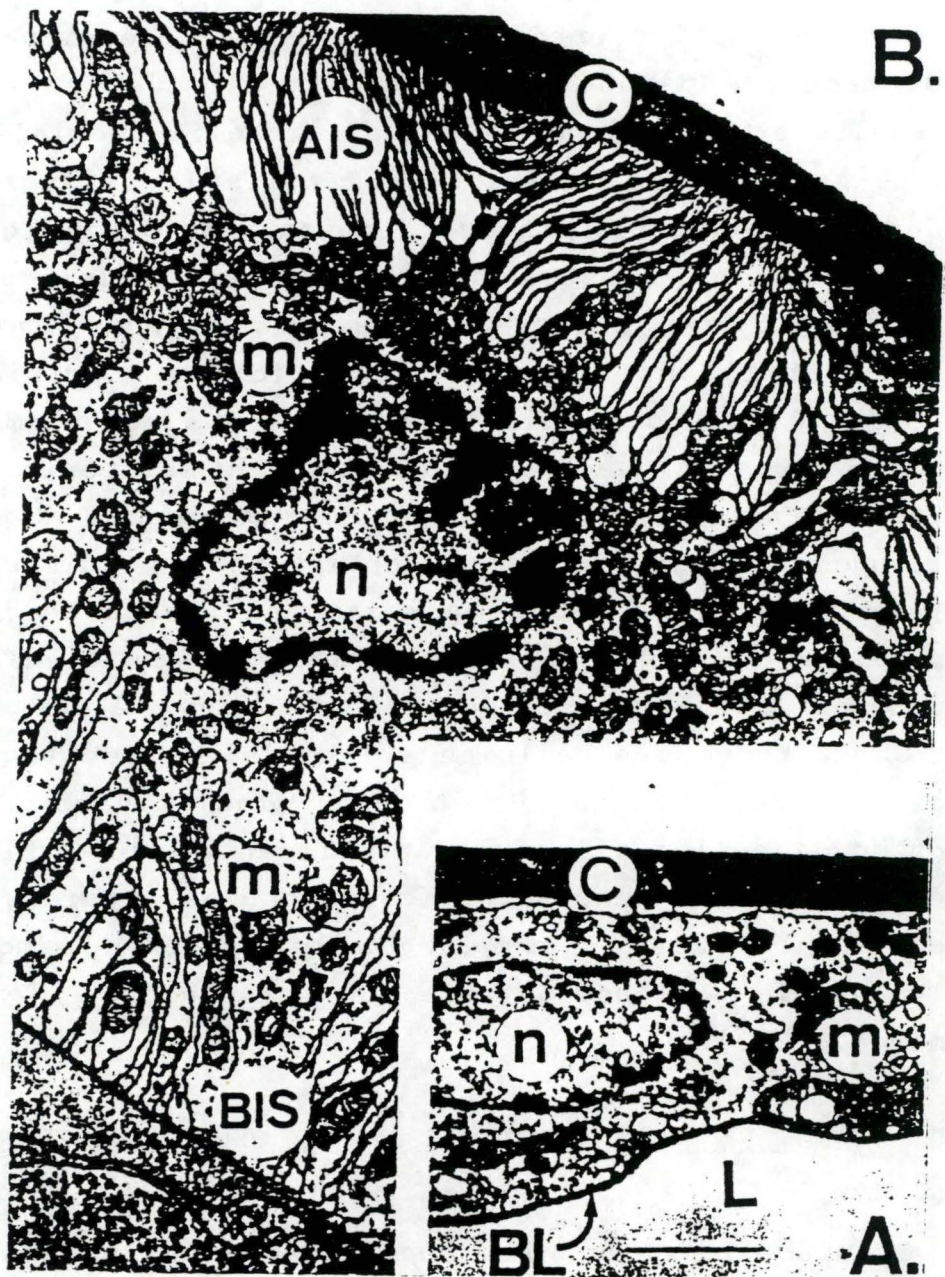


Fig.1: Ultrastructure de cellules épithéliales des lamelles branchiales du crabe chinois *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce. A branchies antérieures; B branchies postérieures (x 17000; bar=1 $\mu$ m). C cuticule; m mitochondries; n noyaux; AIS système d'invaginations apicales; BIS système d'invaginations basolatérales ( d'après Gilles et Péqueux 1981; Barra et al., 1983).

siège primaire de la régulation ionique sanguine [Copeland 1968 - Barra et al., 1983]. Le crabe chinois *Eriocheir Sinensis* présente à ce sujet une caractéristique assez remarquable: seules les trois paires de branchies postérieures montrent une coloration typique argentée, ce qui n'est pas le cas des branchies antérieures.

Ces différences structurales entre branchies postérieures et branchies antérieures suggèrent donc que les branchies postérieures sont concernées par le transport ionique et l'osmorégulation, tandis que les branchies antérieures ne le sont pas. Copeland (1964) avait également montré ce phénomène chez un autre crabe *Gecarcinus lateralis*.

Ces différences fonctionnelles sont corroborées par la mise en évidence de différences ultrastructurelles entre les deux types de branchies (voir figure 1):

- l'épithélium des lamelles branchiales postérieures est plus épais (jusqu'à 10 $\mu$ m et plus) que celui des branchies antérieures (2 à 4 $\mu$ m).

- la cuticule des branchies postérieures est plus fine que celle des branchies antérieures (0,3 $\mu$ m pour les branchies postérieures pour 1 $\mu$ m chez les branchies antérieures).

Au niveau des branchies antérieures, les noyaux des cellules épithéliales font généralement protrusion à l'intérieur de l'espace hémolympatique. Par ailleurs, l'extrémité apicale des cellules situées juste au-dessus de la cuticule possède très peu de replis, ce qui réduit le compartiment extracellulaire. De plus, le nombre d'organelles intercellulaires est très limité et la membrane plasmique ne présente pas de replis baso-latéraux. On attribue une fonction essentiellement respiratoire à ce genre de tissu.

Au niveau des branchies postérieures, on retrouve d'une part un réseau complexe et bien structuré de larges invaginations apicales (=replis membranaires), qui recouvre un large compartiment extracellulaire très caractéristique sous la cuticule.

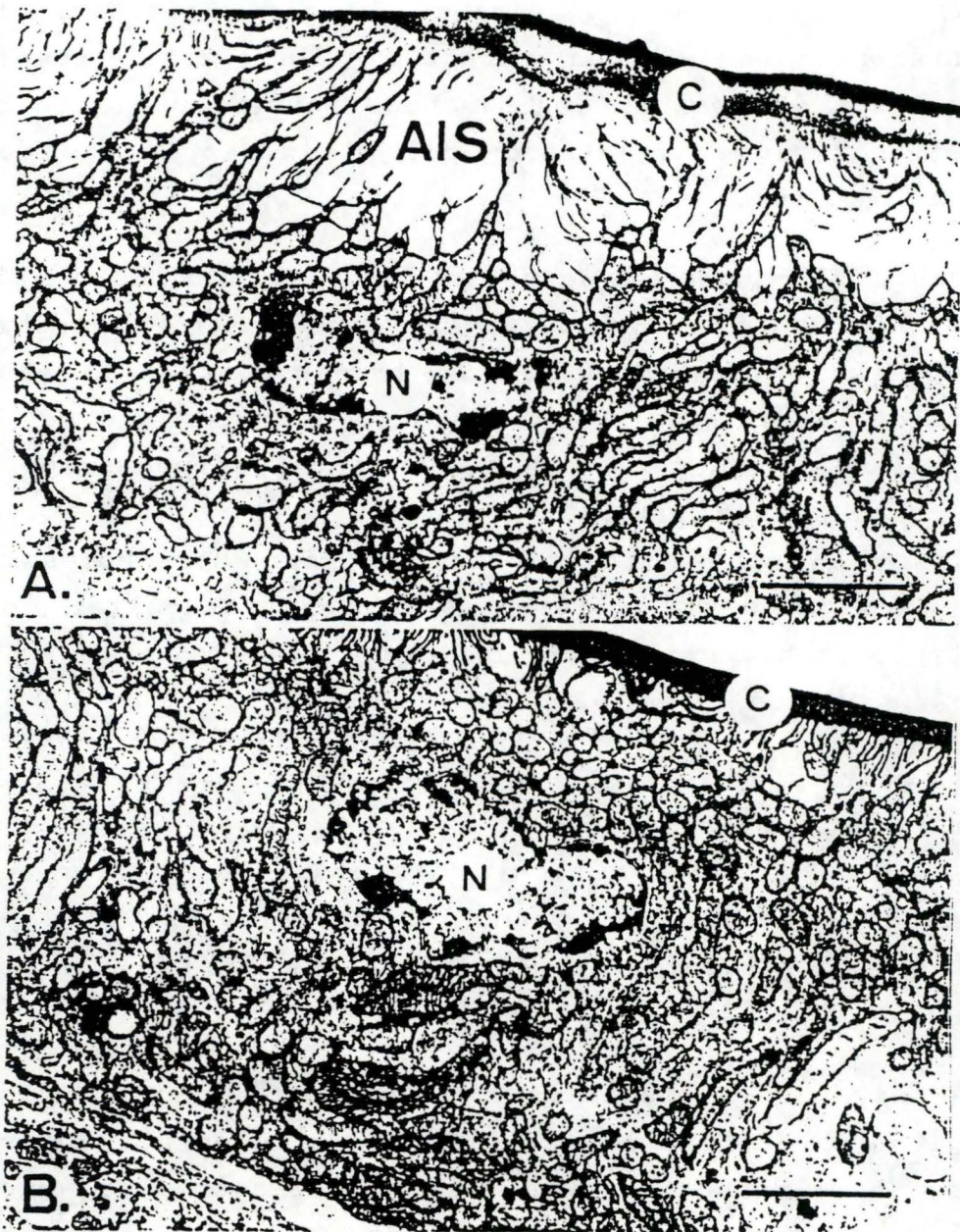


Fig.2: Ultrastructure de l'épithélium des lamelles branchiales du crabe chinois *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce(A) ou à l'eau de mer(B) (x 9000;bar=2 $\mu$ m).C cuticule;n noyaux;AIS système d'invaginations apicales ( d'après Gilles,Péqueux et Barra,non publié).



D'autre part, on est frappé par l'existence de profonds replis baso-latéraux venant en contact étroit avec la membrane de mitochondries.

Ces mitochondries sont très abondantes; elles remplacent quasi complètement l'espace cytoplasmique dans et autour de ces replis.

Ce genre de structure a été également démontré dans la plupart des organes responsables de la régulation hydrominérale chez d'autres groupes d'animaux. Cette structure est caractéristique d'un épithélium transporteur [Bielawski, 1971-Copeland, 1968].

Des variations dans l'ultrastructure épithéliale, liées à des variations dans la fonction physiologique, surviennent lors de l'acclimatation à différentes salinités [Péqueux et Barra, 1980]. Pour les crabes acclimatés à l'eau douce, les branchies postérieures présentent un aspect tel qu'il a été décrit ci-dessus. Par contre, l'acclimatation à l'eau de mer provoque chez de nombreux crabes hyperosmorégulateurs comme *Eriocheir Sinensis* une forte diminution de la surface apicale des cellules au niveau des branchies postérieures. Cette réduction considérable du système de replis à la surface apicale est directement visible au microscope électronique alors que l'ultrastructure de l'épithélium des branchies antérieures reste similaire à celle décrite en eau douce (voir figure 2).

Il semble évident maintenant que, si le mince épithélium des branchies postérieures est le seul impliqué dans le transport actif transépithélial de sels, les mécanismes de transport actif d'ions impliqués dans le contrôle de l'osmolarité du sang chez *Eriocheir Sinensis* doivent être essentiellement limités aux trois paires de branchies postérieures. La preuve nous en sera donnée plus tard par l'étude des flux ioniques sur des préparations de branchies perfusées et isolées que je vais détailler dans le prochain paragraphe.

## 2.2 Aspects physiologiques.

Depuis 1938 (Krogh), on sait que la perte de sels chez les crustacés et les poissons vivant dans un milieu dilué est contrebalancée par une absorption active de NaCl au niveau des branchies.

Une technique pratique de perfusion des branchies développée en laboratoire, est utilisée pour définir et caractériser les flux de Na<sup>+</sup> et de Cl<sup>-</sup> à travers les différents types de branchies d'animaux adaptés à l'eau douce [Schoffeniels et Gilles, 1970 - Péqueux et Gilles, 1978a et b].

On a pu établir que les flux de Na<sup>+</sup> dans les branchies antérieures isolées et perfusées du crabe *Eriocheir Sinensis* sont essentiellement de type passif [Péqueux et Gilles, 1981]. Cela n'empêche pas cependant l'observation de phénomènes pouvant réduire les pertes associées à ce flux passif.

En effet, la perméabilité des branchies antérieures au Na<sup>+</sup> diminue aux faibles concentrations du milieu extérieur. Ceci est capital pour un organisme qui doit réduire la perte de sels lors de l'adaptation aux basses salinités. De plus, l'examen des flux en fonction de la concentration extérieure en Na<sup>+</sup> révèle une cinétique de saturation qui indique que les mouvements de Na<sup>+</sup> à travers les branchies antérieures sont médiés par des transporteurs (diffusion facilitée).

Il existe également un mécanisme de diffusion facilitée au niveau des branchies postérieures, mais quelle que soit l'importance du gradient de Na<sup>+</sup> transépithélial, il n'a jamais été possible de démontrer l'existence d'efflux significatif de Na<sup>+</sup>. Donc, l'entrée de Na<sup>+</sup> au travers de l'épithélium des branchies postérieures doit par conséquent se faire d'une manière active [Péqueux et Gilles, 1981 - Towle, 1981].

Les résultats d'expériences réalisées sur des branchies isolées et perfusées du crabe chinois *Eriocheir Sinensis* sont en accord avec l'idée que des mécanismes de couplage Na<sup>+</sup>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pourraient se produire dans les branchies postérieures. Afin de préserver la neutralité, le Na<sup>+</sup> est échangé contre le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou le H<sup>+</sup>, et le Cl<sup>-</sup> contre HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Bien que ces deux mécanismes

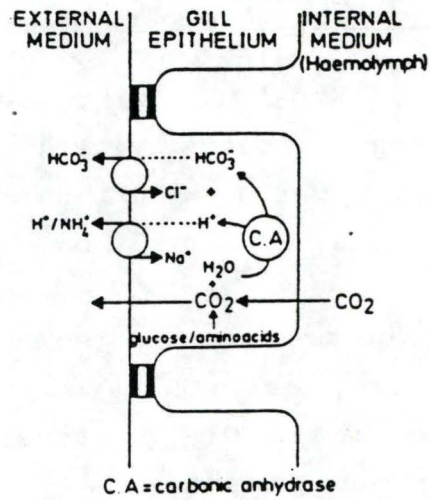


Fig.3 : Modèle reprenant l'intervention de l'anhydrase carbonique dans le transport ionique de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans les cellules épithéliales de branchies postérieures d'*Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce ( d'après Péqueux et al.,1988).

soient distincts, ils sont biochimiquement liés par une anhydrase carbonique qui fournit les ions  $H^+$  et  $HCO_3^-$  nécessaires aux deux échanges (voir figure 3). L'efflux de  $NH_4^+$  est en effet sensible à l'ouabaine. Cela suggère une certaine dépendance vis-à-vis de la concentration externe en  $Na^+$ .

Cependant, la différence entre l'intensité des flux des deux ions concernés est telle que l'hypothèse du seul et nécessaire mécanisme de couplage est improbable. Cette voie d'entrée du  $Na^+$  couplée à l'efflux de  $NH_4^+$  ne représente qu'une petite partie (20%) de l'influx total de  $Na^+$  [Péqueux et Gilles, 1978b - Péqueux et Gilles, 1981].

La majeure partie de l'influx de  $Na^+$  dans les branchies postérieures doit alors être expliquée en admettant un autre processus qui pourrait être, soit un système électrogénique, soit un autre type d'échange notamment avec les ions  $H^+$ , candidats potentiels pour l'échange avec le  $Na^+$ . Pour vérifier cette hypothèse, des études ont été réalisées associant le transport d'ions avec une mesure de la différence de potentiel électrique pour des branchies isolées et perfusées [Péqueux et Gilles, 1981 - Towle, 1984a].

Cette différence de potentiel transépithéliale (PD ou ddp) est le signe de l'activité de diverses pompes qui provoquent un flux d'ions.

Utilisant la technique de perfusion de branchies (voir chapitre III de Matériel et Méthodes), on a pu répondre aux questions que l'on se posait à savoir:

- Comment expliquer la différence de comportement entre les branchies postérieures et les branchies antérieures?

- Quelle peut être la cause d'une variation de la ddp lorsque la concentration en NaCl se modifie?

Des expériences de substitutions d'ions et l'utilisation de substances pharmacodynamiques interférant avec différents systèmes de transport, ont permis l'identification sur ces branchies isolées de plusieurs composantes participant à la ddp et à l'élaboration des mouvements ioniques.

La part possible jouée par les mouvements de cations et d'anions monovalents sur les deux faces de l'épithélium a été étudiée sur les deux types de branchies de la façon suivante:

1) des expériences de substitutions et de variation du taux de  $K^+$  dans la solution de perfusion au niveau des branchies antérieures montrent exclusivement des mouvements passifs de  $Na^+$ .

2) pour ce qui est des branchies postérieures, où l'on observe des mouvements actifs de  $Na^+$  et  $Cl^-$ , l'effet d'inhibiteurs du transport ionique fut testé simultanément avec la substitution d'ions et la variation du niveau de  $K^+$ .

Chez les crustacés, les recherches rendant compte des mesures in vivo des différences de potentiel montrent que l'intérieur de l'animal est habituellement légèrement négatif par rapport à l'extérieur.

Les études concernant le potentiel électrique des branchies ont jusqu'à maintenant été limitées aux branchies postérieures de *Carcinus Maenas*. Celles-ci paraissent de loin plus compliquées que celles d'*Eriocheir Sinensis* [Compere et al., 1985]. On observe en effet des endroits où à la fois l'épithélium respiratoire et l'épithélium de transport se joignent, alors que chez le crabe chinois les branchies postérieures sont tapissées exclusivement d'un épithélium de type transport. En outre, les paires de branchies postérieures et branchies antérieures ne sont pas électriquement équivalentes chez le crabe chinois. Leur polarité est en effet de signe opposé quand elles sont baignées avec la même solution physiologique sur les deux faces de l'épithélium. De plus la ddp varie différemment dans les deux types de branchies selon que le taux de  $NaCl$  dans le milieu d'incubation varie. Cela prouve l'existence de différents types de mouvements ioniques au sein des deux types de branchies [Gilles et Péqueux, 1985 - Péqueux et Gilles, 1988].

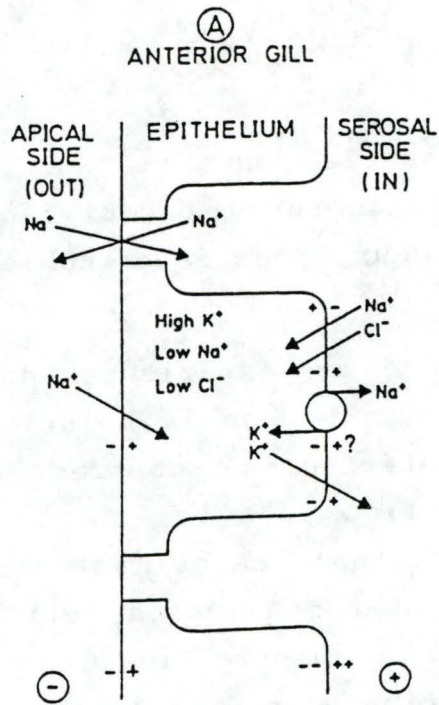


Fig.4 : Modèle reprenant le transport ionique de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> dans les branchies antérieures perfusées du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce ( d'après Gilles et al., 1988).

### a. Les branchies antérieures.

En l'absence de gradients de concentrations d'ions  $[Na^+]$  et  $[Cl^-]$ , la différence de potentiel est toujours positive entre le milieu extérieur et le milieu intérieur et varie de +6 à +60 mV. La polarité est inversée dès que la concentration externe en ion décroît en vue de générer un gradient In/Out d'amplitude suffisante; les branchies antérieures sont donc bien perméables aux ions  $Na^+$ .

A la face sérosale de l'épithélium (séparant le contenu cellulaire de l'hémolymphe), un potentiel de diffusion pour le  $K^+$  et le  $Cl^-$  est partiellement court-circuité par le potentiel de diffusion du  $Na^+$ . Une  $(Na^+-K^+)$  ATPase a été mise en évidence sur cette face. A la face apicale, la différence de potentiel est générée principalement par la diffusion du  $Na^+$ . Le modèle présenté par Péqueux et Gilles (1988) explique les résultats obtenus après substitutions de certains ions par diverses substances comme le TRIS. (voir figure 4)

### b. les branchies postérieures.

Si on empêche la formation d'un gradient transépithélial de  $NaCl$ , les branchies postérieures montrent une différence de potentiel toujours négative à l'intérieur et variant de -5 à -50 mV. Cette différence de potentiel peut être expliquée en considérant les mouvements de diffusion du  $Cl^-$  à la face apicale et les mouvements du  $K^+$  court-circuités par le  $Cl^-$  à la face sérosale [Gilles et Péqueux, 1985].

Les branchies postérieures sont assez perméables au  $Cl^-$ . Suivant les conditions expérimentales, on doit considérer l'existence d'un potentiel de diffusion pour cet ion. Or, le remplacement du  $Cl^-$  dans le milieu d'incubation par le gluconate ou  $NO_3^-$  induit immédiatement une inversion de la ddp qui devient électropositive à l'intérieur de la branchie. Inversement, la substitution du  $Na^+$  par le TRIS ou la choline provoque une élévation importante de l'électronégativité interne. Ces résultats peuvent très bien être expliqués en considérant un modèle selon lequel la ddp est engendrée par un transport de  $Cl^-$  court-circuité par un flux de  $Na^+$ .

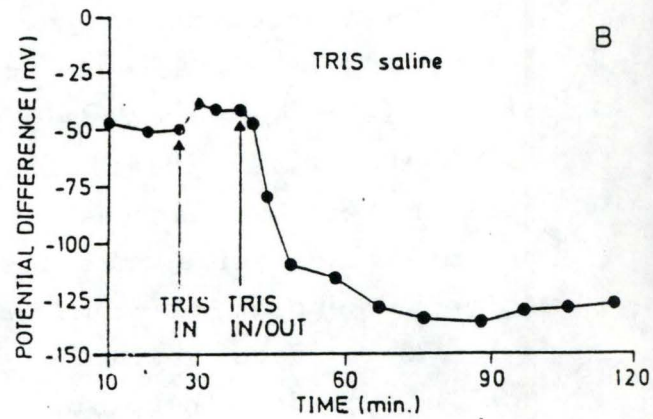
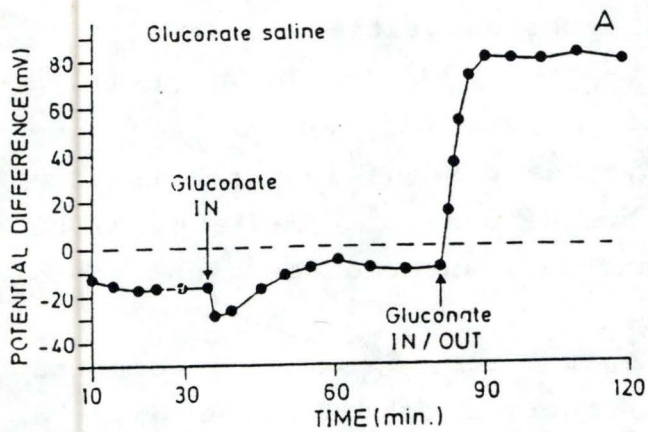


Fig.5a : Effet de la substitution du  $\text{Cl}^-$  (A) ou du  $\text{Na}^+$  (B) par le gluconate ou le TRIS sur la ddp transépithéliale des branchies postérieures, isolées et perfusées, du crabe chinois *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce ( d'après Péqueux et Gilles, 1985 )

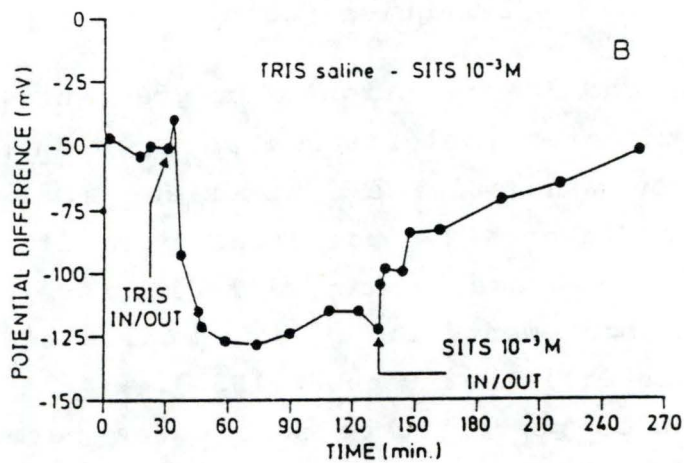


Fig.5b : Effet du SITS sur la ddp transépithéliale des branchies postérieures, isolées et perfusées, du crabe chinois *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.



Ceci montre que la perméabilité des branchies postérieures aux ions  $\text{Na}^+$  est extrêmement basse. En effet, si ce modèle ne se vérifierait pas, la substitution du  $\text{Na}^+$  par le TRIS dans le milieu de perfusion ("Out") entraînerait une chute dans la valeur du potentiel suite à l'établissement d'un gradient de diffusion transépithélial pour le  $\text{Na}^+$ . De même, ce remplacement bloquerait le transport actif de cet ion du côté apical, provoquant ainsi une diminution du taux intracellulaire de  $\text{Na}^+$  et par conséquent une baisse de l'activité de la pompe ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )ATPase localisée du côté séreux ("In"). Donc, la diffusion du  $\text{Cl}^-$ , tout comme celle du  $\text{Na}^+$ , ne joue pas un rôle primordial dans l'établissement de la ddp (figures 5a).

Ce modèle est compatible avec les faits suivants:

- 1) La ddp est dépendant du taux de  $\text{K}^+$  dans la solution de perfusion mais pas dans le milieu d'incubation.
- 2) Le ddp est sensible à l'addition d'ouabaïne, un inhibiteur bien connu de la pompe ATPasique, dans la solution "In" et non dans le milieu "Out".

Quelle est la conséquence de ces observations? Ces expériences de substitution permettent de faire la part des choses quant à la participation des mouvements de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans l'établissement de la différence de potentiel. Cette ddp transépithéliale mesurée au niveau des branchies postérieures peut être donc expliquée en considérant principalement des mouvements du  $\text{K}^+$  et du  $\text{Cl}^-$ . Cependant, les branchies postérieures sont le siège du transport actif d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , l'activité de celui-ci interférant avec l'établissement de la ddp [Péqueux et Gilles, 1981]. L'application d'inhibiteurs du transport lors de la perfusion de branchies et au cours de la mesure de la différence de potentiel donnent une indication supplémentaire sur les mécanismes impliqués dans ces processus. Par rapport au mouvement actif du  $\text{Cl}^-$ , il convient ainsi de remarquer que le SITS (4 acétamido-4' isothiocyantostilben-2-2' disulfonique acide) induit une dépolarisation essentiellement lorsqu'il est additionné au milieu extérieur ("Out"). En outre, cette dépolarisation est particulièrement importante dans les branchies où le TRIS a été utilisé comme substitut du  $\text{Na}^+$  [Gocha et al., 1987]. (figure 5b)

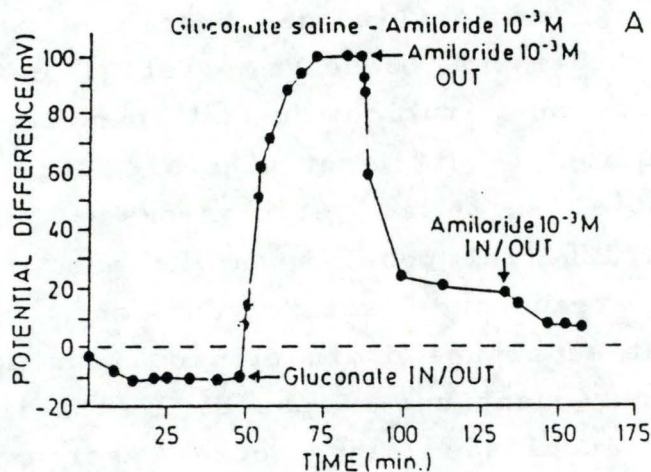


Fig 5c: Effet de l'amiloride sur la ddp transépithéliale des branchies postérieures, isolées et perfusées, du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce (d'après Gilles et Péqueux, 1985).

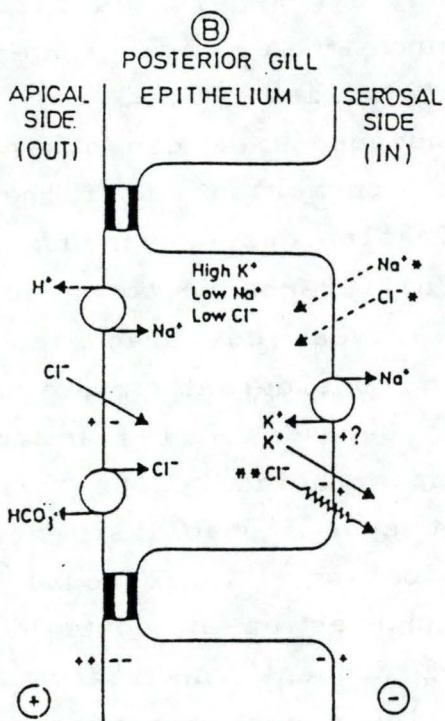


Fig.6 : Modèle reprenant le transport ionique de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans les branchies postérieures perfusées du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce ( d'après Gilles et al., 1988). \*:les mouvements internes de diffusion du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$  à la face sérosale ne jouent pas un rôle important dans l'établissement de la ddp. \*\*:l'efflux de  $\text{Cl}^-$  à la face séreuse est engendré par le potentiel de diffusion du  $\text{K}^+$ .

Cette expérience supporte l'idée qu'un système d'antiport  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est impliqué dans les mouvements internes du  $\text{Cl}^-$  à la face apicale de l'épithélium.

Les mouvements de  $\text{Na}^+$ , eux, sont largement dépendants d'un système de transport sensible à l'amiloride.

Si l'amiloride est ajouté à une préparation dans laquelle le transport de  $\text{Cl}^-$  est bloqué par la présence du gluconate, la différence de potentiel chute rapidement vers des valeurs très basses. Cet effet est particulièrement significatif si l'inhibiteur est additionné au milieu "Out". Comme le système d'échange  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  joue un rôle limité dans le transport de  $\text{Na}^+$  au niveau des branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, ceci est l'indication que la majeure partie du mouvement entrant de sodium se passe sur la face externe de l'épithélium. La part essentielle du pompage actif de  $\text{Na}^+$  à la face apicale des branchies postérieures du crabe chinois est donc réservée au fonctionnement d'un système antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sensible à l'amiloride (figure 5c).

Finalement, la ddp transépithéliale peut s'expliquer en grande partie par l'influx important du  $\text{Cl}^-$  du milieu externe à la face apicale, et la diffusion du  $\text{K}^+$  vers l'hémolymphe.

En outre, à la face sérosale (baignée par l'hémolymphe), plusieurs travaux ont montré l'existence d'une pompe ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPasique qui peut être inhibée par l'ouabaïne [Towle et al., 1976 - Neufeld et al., 1980 - Péqueux et al., 1983]. Cette enzyme membranaire est responsable de l'extrusion de 3 ions  $\text{Na}^+$  de la cellule vers l'hémolymphe et de l'entrée de 2 ions  $\text{K}^+$ . Cet influx permet de compenser la perte cellulaire en  $\text{K}^+$  induite par diffusion et qui entraîne avec lui le  $\text{Cl}^-$ . Lorsque l'ouabaïne est ajoutée au milieu baignant la branchie ("Out"), aucune modification n'apparaît. Par contre, lorsque cet inhibiteur est additionné dans le milieu "In", une hyperpolarisation est visible. En présence de gluconate à la place du  $\text{Cl}^-$ , cet effet est nettement plus marqué.

Le modèle ci-contre permet de résumer les observations précédentes [Gilles et Péqueux, 1985 - Péqueux et Gilles, 1988]. (figure 6)

En résumé, nous pouvons dire que *Eriocheir Sinensis* est un hyperosmoréulateur puissant qui peut facilement s'acclimater à l'eau douce. Chez cette espèce, le fait qu'il n'y ait pas d'efflux significatif de  $\text{Na}^+$  au niveau des branchies postérieures limite fortement la perte de sels en milieux dilués. Cette particularité écophysiological semble être directement liée à l'organisation structurale des branchies [Péqueux et al., 1988].

### 2.3 Conclusion: application du modèle d' "*Eriocheir sinensis*" à d'autres crustacés.

De ce qui précède, il ressort que la branchie du crabe chinois se révèle être un matériel très intéressant pour l'étude des mouvements ioniques transépithéliaux liés à l'osmorégulation sanguine des crustacés. Les branchies sont utilisées comme préparations isolées et perfusées permettant une meilleure approche des mécanismes et forces impliqués dans le transport ionique, par rapport aux travaux classiques in vivo. Lors d'une étude comparative réalisée par Compère et ses collaborateurs en 1985, deux espèces de crustacés ont été confrontées à celle d'*Eriocheir sinensis* au niveau de l'ultrastructure des branchies; il s'agit de *Carcinus maenas* et du tourteau *Cancer pagurus*.

*Cancer pagurus* est un osmoconforme euryhalin incapable de contrôler son osmolalité sanguine. Ses branchies montrent exclusivement un épithélium peu différencié de type respiratoire. L'étude des propriétés de leur différence de potentiel transépithélial ne permet d'identifier aucune activité de transport [Péqueux et al., 1984 - Wanson et al., 1983].

Chez *Carcinus maenas*, un hyperosmoréulateur modéré, on rencontre les deux types d'épithélia. Cependant, contrairement à la situation trouvée chez *Eriocheir sinensis* où les flux passifs de  $\text{Na}^+$  dans les branchies postérieures sont indétectables, d'importants échanges passifs peuvent être enregistrés chez le crabe vert [Siebers et al., 1982]. Cette différence est liée au fait que chez *Eriocheir sinensis*, les branchies postérieures sont essentiellement constituées d'un épithélium de type transport (caractérisée par une faible perméabilité au  $\text{Na}^+$ );

tandis que chez *Carcinus maenas*, à la fois l'épithélium respiratoire (avec une forte perméabilité au  $\text{Na}^+$ ) et l'épithélium de type transport (avec une faible perméabilité) se rencontrent [Siebers et al., 1982].

Il est donc vraisemblable que les performances écophysiologiques modérées du crabe vert soient en relation directe avec le développement restreint du tissu spécialisé dans la récupération active et la limitation des pertes de sels [Gilles 1979].

Une situation assez similaire à celle de *C. maenas* se rencontre chez le crabe bleu *Callinectes sapidus* [Copeland et al., 1968 - Cameron, 1978].

De cette étude comparée des branchies de trois crabes appartenant à des catégories écophysiologiques différentes, il ressort une conclusion particulièrement intéressante : l'organisation ultrastructurale des branchies est directement apparentée aux capacités osmorégulatrices des espèces considérées.

Il apparaît ainsi que le modèle de l'organisation structurale et fonctionnelle de la branchie décrit chez le crabe chinois acclimaté à l'eau douce peut s'appliquer à d'autres crabes euryhalins. Toutefois, l'importance des branchies transportrices du crabe *Eriocheir sinensis* fait de cette espèce un modèle d'étude quasi unique, non seulement pour les processus de transport ionique, mais aussi pour la relation structure/fonction dans un épithélium de ce genre.

### 3. LES BIOAMINES ET L'OSMOREGULATION.

#### 3.1 Introduction.

L'activité physiologique des crustacés, telle qu'elle a été décrite précédemment, est soumise, comme celle des vertébrés, au contrôle de plusieurs hormones. Celles-ci sont produites et stockées dans divers organes neuroendocriniens puis véhiculées par la circulation sanguine jusqu'aux tissus cibles dont vraisemblablement le tissu branchial [Kamemoto, 1976].

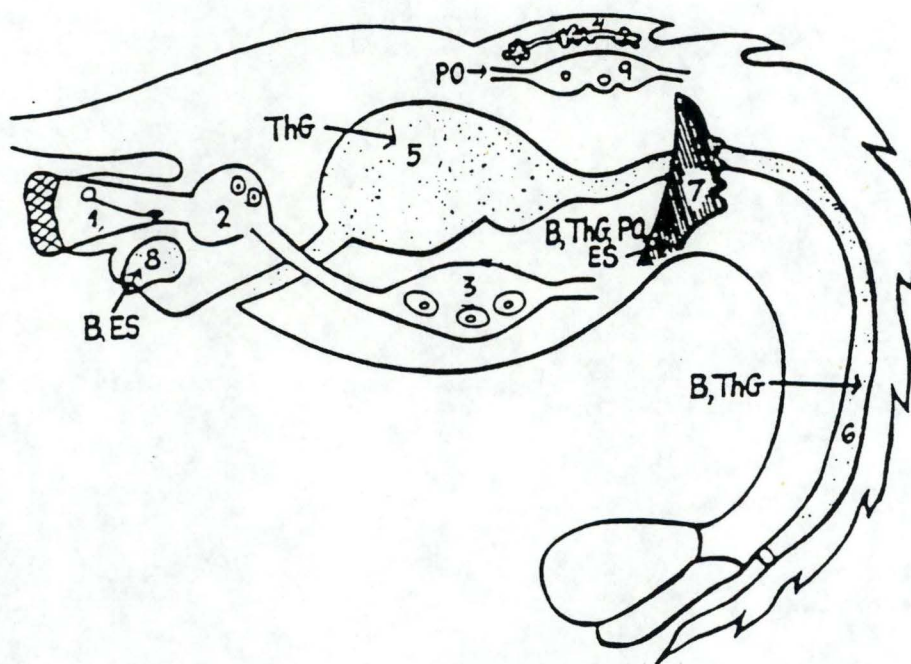


Fig 7: Localisation schématique des organes péricardiques par rapport aux autres centres neuroendocriniens(1-4)et les tissus intervenant dans l'osmorégulation(5-9). 1=pédoncules oculaires (ES) - 2=cerveau (B) - 3=masse de ganglions thoraciques (ThG) -4=organes péricardiques (PO) - 5=proventricule - 6=intestin - 7=branchies - 8=glandes antennaires - 9=coeur.Les cibles de sécrétions neuroendocrines sont indiquées par des flèches.

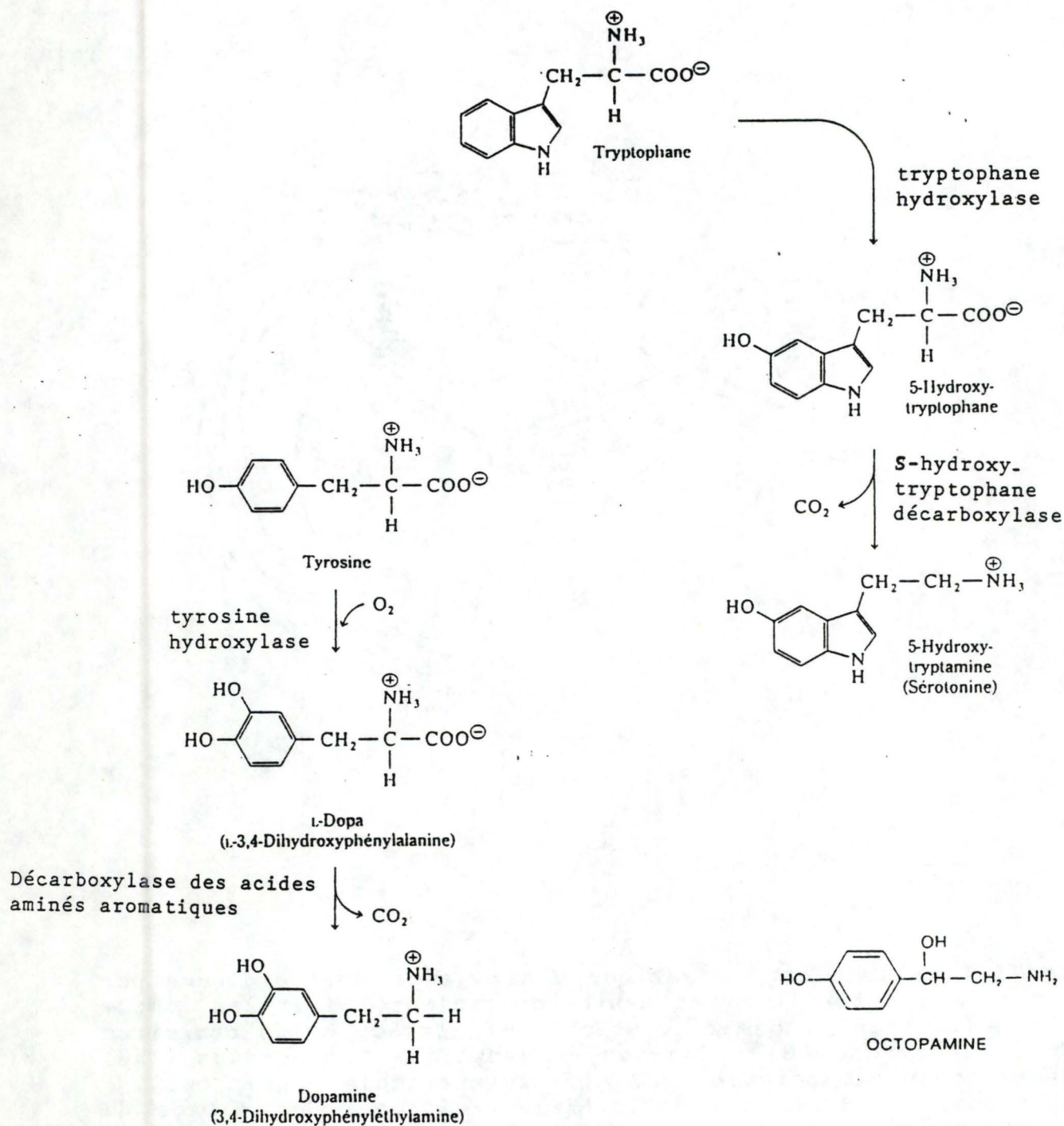


Fig 8: Biosynthèse de la dopamine à partir de la tyrosine; de la sérotonine à partir du tryptophane. (l'octopamine, qui n'est pas représentée ici, est également synthétisée à partir de la tyrosine)

Les substances endocrines, chez les crustacés, sont synthétisées par 4 centres neurotransmetteurs: (figure 7)

a) les **pédoncules oculaires**: ils représentent le lieu principal de la synthèse hormonale.

C'est à leur niveau que l'on rencontre la glande du sinus, située dorsalement à proximité de la *medulla interna* et de la *medulla terminalis*. C'est le centre de contrôle neuroendocrinien principal des crustacés. De là sont libérées des hormones qui, via l'hémolymphe, aboutiront à d'autres formations endocrines ou stimuleront directement l'organe-cible. En fait, la glande du sinus qui est un organe neurohémal représente à la fois un tissu glandulaire et un ensemble de terminaisons neurosécrétrices provenant de divers centres de synthèse d'hormones: l'organe X, d'où partent plus ou moins 90 % des neurones, les ganglions thoraciques et le cerveau.

b) les **organes péricardiques**: ce sont des structures neurohémales qui se situent dans la cavité veineuse entourant le coeur. Chez les crustacés décapodes brachyours tel *Eriocheir Sinensis*, ils sont localisés latéralement et constitués de deux troncs longitudinaux connectés aux ouvertures des veines branchio-cardiaques par des travées verticales. Ces organes synthétisent trois bioamines (la dopamine, la sérotonine, l'octopamine) et des peptides cardiostimulateurs [Cook et Sullivan, 1982]. Ces substances neuroendocrines sont synthétisées à partir de deux acides aminés (la phénylalanine et le tryptophane) comme l'indique la figure 8.

c) Situé dans les chambres branchiales sur la face ventrale du crustacé, l'**organe Y**, décrit pour la première fois par Gabe (1953), est responsable de l'initiation de la mue.

d) les **ganglions thoraciques**: ces structures synthétisent l'hormone diurétique. Elle est véhiculée par des axones vers son lieu de stockage, la glande du sinus [Kamemoto, 1976].



### 3.2 L'action hormonale chez les invertébrés.

#### 3.2.1 Invertébrés non arthropodes.

Chez diverses espèces de moules d'eau douce et dans différents organes, on a pu montrer une stimulation de l'adénylate cyclase par la **sérotonine** [Scheide et Dietz, 1983].

Une étude plus fine sur deux espèces, *Ligumia subrostrata* et *Carunculina texasensis*, a permis de démontrer que lorsque les branchies sont incubées en présence de sérotonine  $10^{-4}M$ , leur contenu en AMP cyclique augmente d'un facteur 2,5 par rapport à la concentration basale et cela en l'espace de la minute. La **dopamine**, l'**adrénaline** et la **noradrénaline** à une concentration de  $10^{-4}M$  ainsi que la dopamine à une concentration  $10^{-5}M$  donnent le même résultat [Scheide et Dietz, 1986].

Des études sur les systèmes de transport présents chez ces mollusques ont pu montrer que l'influx de Na dans la branchie augmente 30 minutes après injection de dopamine ou de **dibutyryl AMP cyclique** dans le sang [Scheide et Dietz, 1982]. Ces mêmes auteurs mettent également en évidence l'action de la sérotonine sur le flux entrant de sodium dans une préparation de branchies isolées et perfusées de ces mêmes invertébrés. Leurs résultats mettent en valeur l'importance des processus du transport actif de  $Na^+$ , avec un avantage particulier pour la sérotonine qui est capable de stimuler spécifiquement l'adénylate cyclase, une enzyme essentielle pour l'osmorégulation.

Ce système de régulation où intervient l'AMP cyclique, et identifié chez ces moules, est de même nature que celui trouvé dans les branchies du mollusque marin *Aplysia californica* où à la fois **dopamine** et **sérotonine** augmentent le taux d'AMP cyclique dans les tissus branchiaux et stimulent l'adénylate cyclase [Weiss et Drummond, 1981].

### 3.2.2 Crustacés.

La branchie comme cible de facteurs hormonaux et des bioamines.

#### A L'hormone hyperglycémiante.

Le facteur hyperglycémiant (CHH) est synthétisé par l'organe X et libéré dans l'hémolymphe via la glande du sinus des pédoncules oculaires.

Il induit la glycogénolyse dans le tégument et les branchies du crabe *Uca pugilator* [Keller et Andrew, 1973]. Cette dégradation du glycogène est également observée chez d'autres crabes lorsqu'on traite ces crustacés avec des nucléotides cycliques. De telles observations laissent supposer que l'AMP cyclique et le GMP cyclique puissent être les messagers secondaires intracellulaires de l'hormone [Spindler, Willig et Keller, 1975]. De fait, parallèlement à l'induction de la glycogénolyse, la CHH induit une nette élévation du taux d'AMP et de GMP cycliques dans le tube digestif et les glandes antennaires de l'écrevisse *Orconectes limosus*. Cependant, son action éventuelle sur les branchies de cet arthropode n'a pas été prise en considération [Keller et Seldmeier, 1978 et 1981].

#### B Les bioamines et les nucléotides cycliques.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont été réalisés et qui visent à expliquer l'action hormonale dans la régulation hydrominérale des crustacés. Parmi les neurohormones testées, on rencontre la **dopamine**, la **sérotonine** (ou **5'hydroxytryptamine**) et l'**octopamine**.

Les premiers résultats qui ont appuyé l'hypothèse selon laquelle la branchie est un tissu-cible de tels composés mettent en évidence la présence de leurs récepteurs au niveau des branchies du homard *Homarus americanus* [Renard, 1980].

Tout comme la CHH, les amines biogènes ont un effet hyperglycémiant. Dès 1966, ce phénomène a été observé dans les tissus du crabe chinois *Eriocheir sinensis* [Bauchau et Mengeot, 1966] et plus tard, chez *Homarus americanus* [Battele et Kravitz, 1977- Renard, 1980].

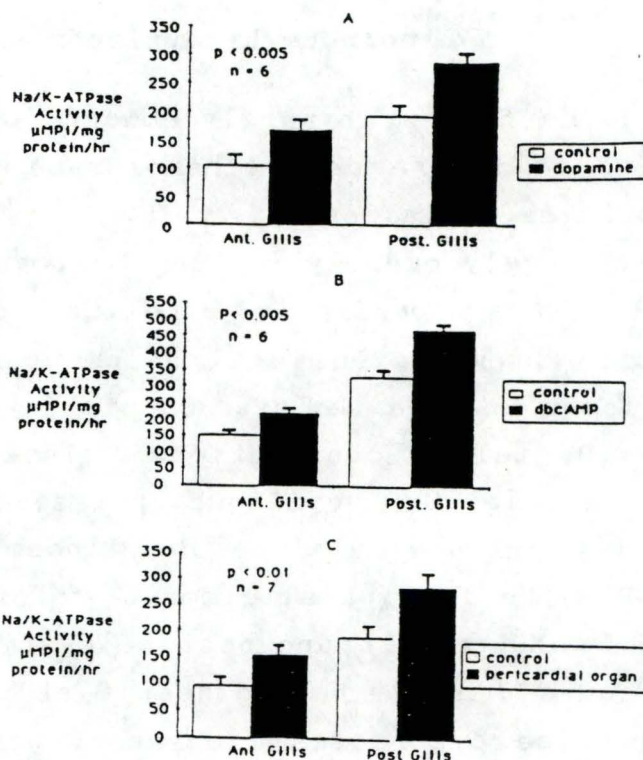


Fig 9: Effets de la dopamine(A), du dibutyryl AMPc(B), et des extraits d'organes péricardiques(C) sur les activités de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase dans une fraction microsomale de branchies antérieures et postérieures du crabe *Carcinus maenas*. On injecta les crabes avec 0,5 ml de dopamine  $10^{-5}$ M ou avec un extrait de 4 organes péricardiques. Pour ces expériences, les crabes contrôles furent injectés avec un Ringer préalablement chauffé. Pour l'étude de l'effet de l'AMPc, les branchies isolées furent incubées pendant deux heures en présence de dbAMPc  $10^{-5}$ M. (d'après Mantel et Sommer, 1988)

Ces auteurs ont montré aussi que l'effet de la bioamine peut soit être mimé par les nucléotides cycliques, soit s'accompagner d'une augmentation de leur concentration. Enfin, dans les branchies du homard *Homarus americanus*, la sérotonine induit, via l'AMP cyclique, la phosphorylation d'une protéine de 29 kdaltons [Goy et al., 1984].

Même s'il n'a pas encore été possible d'identifier toutes les molécules intervenant dans le contrôle des flux d'eau et d'ions, il est clair que les centres neurosécréteurs tels que la glande sinusaire, le cerveau, les ganglions thoraciques sous-oesophagiens et l'organe péricardique sont responsables de la synthèse d'un bon nombre d'entre elles [Mantel et al., 1985]. Examinons maintenant les résultats d'expériences mettant en exergue la participation possible des bioamines dans l'homéostasie ionique.

Chez un crustacé hyperrégulateur, *Callinectes sapidus*, la perfusion de branchies avec un extrait d'organe péricardique, dont sont issues les amines biogènes, induit une augmentation de l'influx de sodium de même que celle de la concentration en AMP cyclique [Kamemoto et Oyama, 1985]. Les mêmes résultats ont été obtenus en perfusant les branchies avec l'**octopamine** et la **dopamine**. Comme ces substances augmentent la concentration en ce nucléotide cyclique, il est hautement probable que ces hormones soient des facteurs de l'hémolymphe qui favorisent la prise de sels à travers l'épithélium [Lorhmann et Kamemoto, 1987].

L'influx actif d'ions  $\text{Na}^+$ , à travers l'épithélium branchial est, comme on l'a vu, le mécanisme primordial pour l'établissement d'une régulation hyperosmotique. Les études réalisées sur le crabe vert *Carcinus maenas* ont montré que l'injection de dopamine à une concentration  $10^{-5}$  M, ou de dibutyryl AMP cyclique à une concentration  $10^{-6}$  M, provoque une augmentation de l'influx de  $^{22}\text{Na}$  chez ce crabe acclimaté à l'eau douce [Mantel et Sommer, 1988]. On observe le même effet si on injecte des extraits d'organe péricardique, ce qui confirme les résultats antérieurs de Kamemoto et Oyama (figure 9). Ces mêmes auteurs ont pu mettre également en évidence une activation immédiate de la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) \text{ATPase}$ . Chez cette même

espèce, l'**octopamine** peut aussi moduler la concentration en AMP cyclique branchial. Cependant, l'augmentation est moins marquée qu'avec la dopamine [Sommer, M.J. 1985].

Ces études réalisées sur les crustacés confirment les résultats obtenus auparavant par Scheide et ses collaborateurs (1982-1983-1986) lors de leurs travaux sur les invertébrés non arthropodes (voir point 3.2.1 de ce chapitre).

Plus récemment, dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce, Trausch et al. (1989) ont pu associer à l'effet de la dopamine et de la sérotonine la phosphorylation de protéines membranaires par le système dépendant de l'AMP cyclique cytoplasmique.

Si l'on considère l'ensemble de ces observations et les travaux de Zatta (1987) qui ont montré une augmentation de la concentration en **dopamine** dans l'hémolymphe du crabe *Carcinus maenas* après transfert de l'animal d'un milieu "Sea water" normal (100 %) à un milieu dilué, tout porte à croire que cette bioamine, libérée par l'organe péricardique, intervient dans l'ionorégulation à court terme via l'activation de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase préexistante. Cette capacité que possèdent *Carcinus maenas* et d'autres crustacés décapodes à "hyperréguler" rapidement après passage dans un milieu dilué témoigne de cette activation à court terme de l'enzyme en question [Péqueux et Gilles 1984].

Cette activation à court terme a été également démontrée chez le crabe bleu, *Callinectes sapidus*. Quand on injecte de l'hémolymphe provenant de crabes acclimatés à l'eau de mer (30%) chez ces mêmes crabes acclimatés à un milieu "Sea water" (100%), on remarque une augmentation de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase branchiale qui se produit 25 minutes après injection. Ces résultats peuvent être mis en corrélation avec une élévation de la prise de sels par la branchie [Savage et Robinson, 1983]. Ce dernier exemple suggère qu'une activation à court terme de l'enzyme existe et est contrôlée par certains facteurs libérés par l'hémolymphe d'un crabe acclimaté à l'eau douce.

Au terme de cette analyse, dans laquelle on a souligné l'importance des branchies dans l'homéostasie hydrominérale, il nous paraît nécessaire d'examiner les mécanismes qui régissent

la transduction intracellulaire du message hormonal extracellulaire.

### 3.3 Les bioamines et la transduction hormonale.

Afin d'assurer la coordination du développement de l'organisme ainsi que celle de la croissance, de la différenciation et du métabolisme au sein d'un tissu, les cellules ont dû élaborer un système de communication très perfectionné. De fait, il existe des molécules extracellulaires dont le rôle est de servir de signal. De nombreuses substances chimiques sont libérées par des cellules spécialisées et leur message est décrit au niveau de cellules-cibles.

Les hormones font partie de ces signaux qui, une fois libérés dans le sang par un organe endocrinien, à des doses infinitésimales, modifient instantanément le métabolisme de la cellule-cible.

Les bioamines font partie également de ces signaux car elles appartiennent au groupe des substances appelées hormones ou substances neuroendocrines. De façon générale, les hormones à l'exception des stéroïdes, stimulent les cellules par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques de nature glycoprotéiniques [Kahn, 1975]. Une fois stimulés, ils activent un enzyme responsable de la synthèse d'un messager secondaire qui, lui, exerce son action dans le cytosol. Il existe plusieurs seconds messagers, chacun étant l'élément central d'un système de contrôle avec des stimuli externes spécifiques, un mode particulier de libération dans le cytoplasme, des enzymes rigoureusement contrôlées, des réponses biochimiques à l'échelle de la cellule et des effets physiologiques résultants à l'échelle de l'organisme.

Citons parmi les seconds messagers, le système de l'**AMP Cyclique** et du **GMP cyclique**, le **diacylglycérol** qui agit en synergie avec l'**inositol triphosphate**, l'ion  $\text{Ca}^{++}$  qui peut fonctionner avec le système précédent de même qu'avec la **calmoduline**.

La transduction du signal externe en message interne se réalise grâce à une série de protéines intramembranaires (les protéines G) qui transmettent chacune l'information en induisant des changements de conformation d'une autre protéine. C'est en

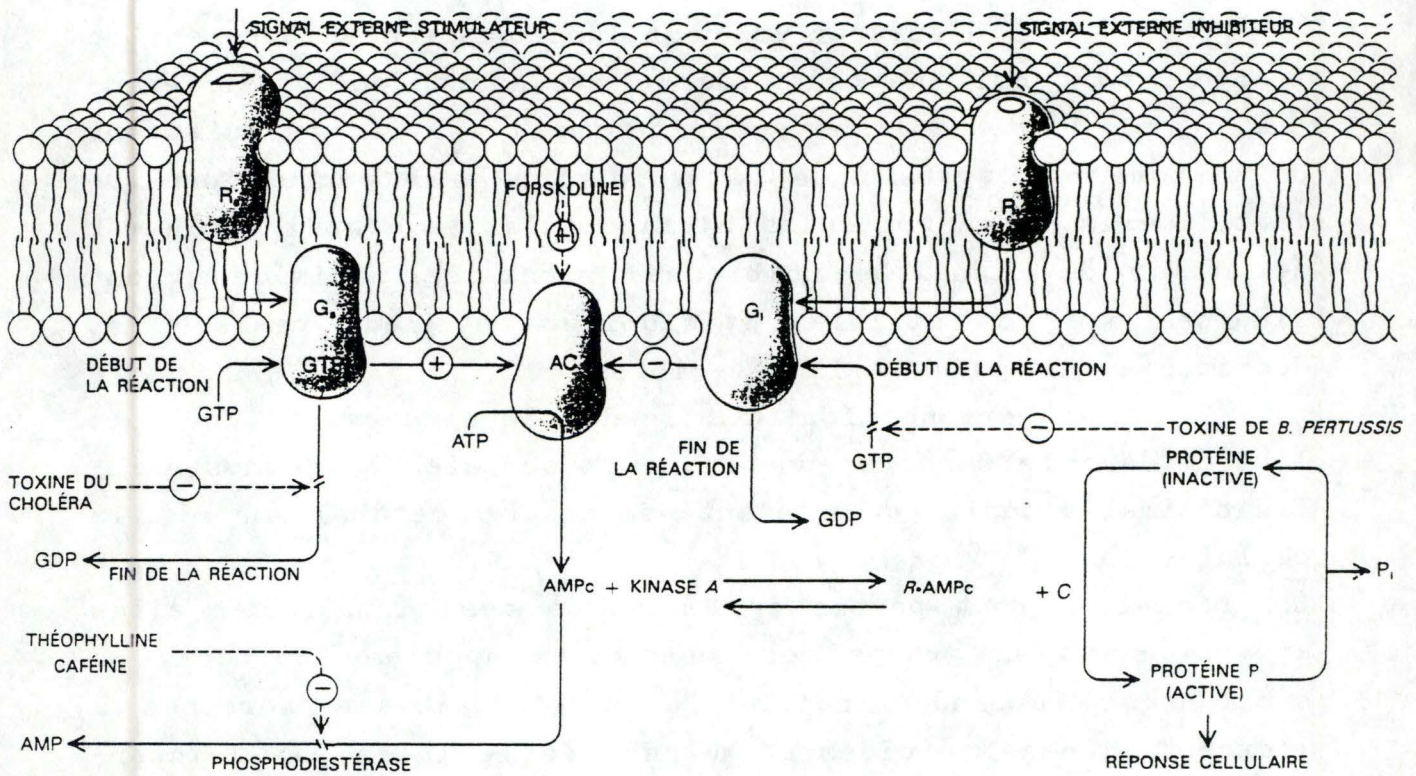


Fig 10: Modèle d'activation de la protéine kinase A  
 ( $R_s$ ) Récepteur stimulateur ( $G_s$ ) Protéine G stimulatrice  
 ( $R_i$ ) Récepteur inhibiteur ( $G_i$ ) Protéine G inhibitrice  
 A.C : adénylate cyclase  
 (d'après Berridge, 1985)

fin de chaîne qu'interviennent ces messagers secondaires qui sont chargés de la propagation rapide du signal dans toute la cellule.

Nous allons tout particulièrement porter notre attention sur le système de l'**AMP cyclique**. En effet, on peut conclure des expériences présentées ci-dessus l'affirmation suivant laquelle, aussi bien la **dopamine** que l'**octopamine** provoquent une augmentation significative du taux d'AMP cyclique par stimulation de l'adénylate cyclase, avec augmentation concomitante de l'activité de la ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ) ATPase [Mantel et Sommer, 1988].

L'adénosine 3',5'-monophosphate (AMP cyclique) est un messager secondaire cytoplasmique qui est synthétisé, sous l'influence d'un agoniste externe, par l'adénylate cyclase membranaire et à partir d'adénosine 5'-triphosphate (ATP). Son rôle est de contrôler et synchroniser certains mécanismes biochimiques inclus dans la réponse physiologique. Si on examine la figure 10 reprise ci-contre, voici comment on peut expliquer la transmission du signal stimulateur jusqu'à la production du messager secondaire.

Après la fixation d'une hormone (H) sur le récepteur ( $R_s$ ), la modification de sa structure tridimensionnelle affecte une protéine intermédiaire appelée protéine G constituée de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$ , cette dernière pouvant se mouvoir dans la bicouche membranaire. C'est l'élément  $\alpha$  qui transmet l'information si il a pu fixer préalablement une molécule de GTP. Ce nucléotide peut s'y lier uniquement si  $\beta$  et  $\alpha$  se sont associées transitoirement; ces dernières doivent se séparer ensuite pour que le changement de conformation initial puisse atteindre et induire l'activation de l'adénylate cyclase. Ce système est autorégulé puisque la sous-unité  $\alpha$  peut elle-même s'inactiver par clivage du GTP en GDP.

Quant au système inhibiteur (I), il est constitué des mêmes éléments que le système stimulateur (S) et fonctionne de manière identique [Berridge, 1985]. Il faut cependant souligner que ces deux voies ne peuvent être activées simultanément, l'activation de l'une déprimant l'autre, car la sous-unité  $\beta$  est commune aux



deux mécanismes; une fois impliquée dans l'un des processus, elle ne peut évidemment pas se lier à l'autre protéine G.

Une fois ce système enclenché, l'AMP cyclique se lie à la sous-unité régulatrice (R) d'une protéine kinase, la **protéine kinase A** ce qui libère la sous-unité catalytique (C) qui peut alors phosphoryler des protéines responsables d'une réponse cellulaire donnée comme par exemple l'activation du processus de transport actif de  $\text{Na}^+$  au niveau de la branchie des crustacés décapodes.

Il convient de remarquer que ce nucléotide cyclique représente un intermédiaire à large spectre, activant donc les **protéines kinases A** avec pour échéance la phosphorylation de leur substrat protéique dont les protéines membranaires participant aux mécanismes de transport ionique et même des protéines solubles dont les enzymes. Des études antérieures dans notre laboratoire ont d'ailleurs démontré la présence d'une activité protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique et d'une activité protéine kinase C dans les branchies postérieures et antérieures des crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce [Trausch et al., 1985]. Dans une étude récente, Bianchini et Gilles (1990) ont montré que l'AMPc est étroitement impliqué dans le contrôle des mouvements transépithéliaux de  $\text{NaCl}$  dans les branchies de ce crabe par activation de la pompe ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPasique et des canaux à  $\text{Cl}^-$  situés à la face interne de l'épithélium. Ces effets de l'AMPc observés lors de ce travail peuvent être interprétés en terme de variation de l'activité des divers composants qui ont été récemment mises en évidence comme participant aux mouvements ioniques et à l'établissement de la ddp dans les branchies postérieures du crabe chinois [Péqueux et Gilles, 1988 - Gilles et al., 1988].

Les résultats de Asselbourg et al (1991) confirment que d'autres systèmes de contrôles sont concernés dans la prise de sels par les branchies de crustacés en modulant les processus de transport localisés à la face sérosale; c'est probablement le cas de la **protéine kinase C**. L'implication possible de ce système dans le contrôle du transport ionique fut étudiée sur une préparation de branchies postérieures isolées et perfusées du crabe *E. sinensis* acclimaté à l'eau douce.

L'O.A.G(1-oleyl-2-acétyl-sn-glycérol) et le P.M.S(phorbol-12-myristate-13-acétate) ,deux activateurs de la protéine kinase C, induisent une dépolarisation de la ddp et une augmentation de l'influx transépithélial de  $\text{Na}^+$  lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de perfusion[Asselbourg *et al.*,1991].

Par contre, ces modulateurs restent sans effet sur le flux de  $\text{Cl}^-$ . Ces résultats sont en accord avec une activation, par l'intermédiaire de la protéine kinase C, de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase.

### 3.4 Conclusion.

Tout ce qui précède montre donc que la branchie constitue un des organes-cibles des bioamines. Ces expériences mettent en exergue un rôle plus que probable des facteurs neuroendocriniens dans l'osmorégulation des crustacés. Elles indiquent aussi que les messagers secondaires comme l'AMP cyclique pourraient agir comme médiateurs intracellulaires de ce processus. L'identification de protéines kinases dans de nombreux tissus de crustacés dont les **protéines kinases A et G** dans les branchies du homard[Trausch,1975 - Renard,1980]et la **protéine kinase C** dans les branchies postérieures du crabe chinois [Asselbourg,1989] permet d'une manière plus explicite de décortiquer le mécanisme hormonal mis en place dans les branchies de crustacés. C'est sur base de ces résultats que nous allons construire notre travail en nous attachant tout particulièrement aux conséquences de ces mécanismes hormonaux sophistiqués sur la physiologie et le métabolisme de la branchie. C'est ainsi que nous allons considérer les possibilités de sources énergétiques qui sont proposées au crabe *Eriocheir sinensis* lors de l'adaptation à un milieu hyposalin.

# CHAPITRE II

## LE TRANSPORT IONIQUE ET SON METABOLISME.

### 1. INTRODUCTION.

Après avoir considéré le contrôle hormonal de l'activité des pompes ioniques, nous allons aborder au cours de ce chapitre le métabolisme énergétique des crustacés en essayant de répondre aux questions suivantes:

1) Comment concilier le métabolisme énergétique des branchies avec l'activité de transport ionique?

2) Quels sont les effets de la salinité sur les structures protéiques impliquées dans les processus métaboliques extra- et intracellulaires?

### 2. BIOCHIMIE DE LA BRANCHIE.

#### 2.1 La $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase.

Deux catégories d'enzymes sont étroitement associées aux mécanismes d'osmorégulation dans les branchies. Il s'agit d'une part de l'anhydrase carbonique, dont le rôle a été exposé au chapitre précédent, et d'autre part des ATPases membranaires parmi lesquelles la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) \text{ATPase}$  qui semble être un des enzymes principaux concernés par le processus actif du transport ionique [Péqueux et Gilles, 1977 - Gilles et Péqueux, 1985 - Towle, 1981].

La présence de cette  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) \text{ATPase}$  dans les branchies de crabes a été démontrée par plusieurs auteurs [Neufeld *et al.*, 1980 - Péqueux *et al.*, 1983 - Towle *et al.*, 1976].

Cette enzyme que l'on retrouve sur la face sérosale des deux types branchiaux semble jouer un rôle important dans l'adaptation des animaux à des milieux de salinités différentes [Towle, 1984a].

Chez les crustacés, cette enzyme membranaire est similaire à celle trouvée chez les vertébrés. Elle requiert absolument les ions  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  et elle est inhibée par l'ouabaïne. Elle a été purifiée à partir des glandes de Neck d'*Artemia salina*; elle est constituée de deux sous-unités: l'unité  $\alpha$  qui est la sous-unité catalytique de  $\pm 100$  kD possédant les sites de liaison du  $Na^+$ , du  $K^+$  et de l'ATP; et la sous-unité  $\beta$  qui est une glycoprotéine de 40 kD dont la fonction reste encore obscure [Mantel et Farmer, 1983].

La localisation de la ( $Na^+ - K^+$ ) ATPase dans les branchies de *Carcinus maenas* a été étudiée par Siebers et ses collaborateurs [Siebers et al., 1982]. Ils ont montré que l'ouabaïne, ajoutée au milieu d'incubation à une concentration  $10^{-4} M$ , n'affecte pas l'osmolalité de l'hémolymphe. Cependant, l'injection d'ouabaïne à l'intérieur de l'animal à une concentration  $10^{-5} M$  réduit l'osmolalité du sang. Ces résultats suggèrent que la ( $Na^+ - K^+$ ) ATPase est localisée dans la partie basolatérale de l'épithélium branchial, c'est-à-dire en contact étroit avec l'hémolymphe. L'étude récente réalisée par Towle et Kays (1986) a vérifié cette localisation de l'enzyme dans les branchies de *Carcinus maenas* et *Callinectes sapidus*.

Chez le crabe chinois, une activité ( $Na^+ - K^+$ ) ATPasique élevée caractérise l'épithélium branchial de type transporteur, c'est-à-dire celui des branchies postérieures où l'activité enzymatique est plus importante que dans les branchies antérieures. Ces différences d'activité reflètent les différences fonctionnelles, en relation avec la localisation des systèmes de transport actif à travers l'épithélium [Péqueux et al., 1984]. En effet, l'épithélium des branchies postérieures posséderait plus de sites de transport ( $Na^+ - K^+$ ) ATPase dans la partie basolatérale de la cellule épithéliale [Péqueux et Gilles, 1988].

Une augmentation de l'activité enzymatique a été également observée dans les branchies postérieures de *Callinectes sapidus* [Neufeld et al., 1980], de *Carcinus maenas* [Siebers et

al.,1982] et chez *Thalamita crenata*[Spencer et al.,1979], lorsque ces crabes sont acclimatés à un milieu dilué.

De plus,on a pu démontrer qu'une acclimatation des crabes chinois à des milieux de salinité réduite provoque une augmentation importante de l'activité enzymatique uniquement dans les branchies postérieures:le surplus d'activité spécifique observé apparaît après 48 heures d'adaptation à l'eau douce[Péqueux et al.,1984].Cependant,aucune différence n'a été détectée entre les caractéristiques cinétiques enzymatiques chez *Eriocheir sinensis* adapté à un milieu dilué ou à l'eau de mer.Il semble donc que l'adaptation aux milieux de salinité différentes n'induit pas la synthèse d'ATPases cinétiquement différentes mais peut modifier la quantité de molécules enzymatiques.Généralement,l'activation est donc concomitante à la modification de salinité;c'est le cas notamment pour *Carcinus maenas* et pour le crabe hermite *Clibanarius vittatus*[Péqueux et al.,1988].Toutefois,dans certaines espèces,la relation semble indirecte.Ainsi,l'activation maximale de l'enzyme branchiale d'*Uca pugilator* nécessite un séjour de plus de 100 heures en milieu dilué alors que la concentration osmotique est stabilisée dès la dixième heure[Mantel et al.,1977].

Chez les crabes violons,*Uca pugilator* et *Uca pugnax*,l'activité de la (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase dans les branchies postérieures augmentent significativement après transfert de ces crabes de l'eau de mer à un milieu dilué[Holliday,1985].

Péqueux et al (1984) émettent l'hypothèse qu'une adaptation à court terme se ferait via l'activation de la (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase préexistante et à long terme,via une synthèse de nouvelles molécules d'enzymes.Cette synthèse *de novo* a été observée chez *Artemia salina*[Conte et al.,1977].

Il est clair qu'une adaptation à court terme est nécessaire pour résoudre ce problème de régulation ionique en eau douce.Cette acclimatation rapide est la conséquence d'une activation de la (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase,comme l'ont démontré Towle et ses collaborateurs(1976) au cours de leurs travaux sur le crabe bleu.

De fait, ces auteurs ont constaté, après acclimatation des crabes *Callinectes sapidus* à l'eau de mer (15%), un accroissement de l'activité spécifique de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase dans les trois premières heures.

Ce résultat laisse entrevoir que le phénomène est différent de celui observé par Neufeld (1980); en effet, lors de l'acclimatation de ces mêmes crabes à l'eau douce, Neufeld et ses collaborateurs observent également une élévation de l'activité spécifique de l'enzyme, mais celle-ci est progressive et s'étend sur une période de 5 à 8 jours.

Si on ajoute à ces expériences les résultats de Savage et Robinson (1983), signalés dans le chapitre précédent, on remarque qu'il existe, d'une part un changement à long terme de l'activité spécifique de l'enzyme qui peut être lié à une modification structurale de l'épithélium branchial, et d'autre part un changement à court terme de l'activité enzymatique de la pompe ATPasique par un ou plusieurs facteurs que l'on retrouve dans l'hémolymphe. Dans le chapitre précédent, nous avons envisagé que les bioamines puissent être concernées dans cette modification à court terme de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase. D'un autre côté, cette activation caractérisée par une augmentation significative du transport actif d'ions nécessite un taux de conversion rapide de l'ATP en ADP proportionnellement aux exigences énergétiques croissantes de l'activation cellulaire chez un crabe acclimaté à l'eau douce. L'ATP utilisé devra donc être reformé pour permettre un fonctionnement continu des pompes ioniques. Comment, par quel mécanisme le crabe va-t-il restaurer son pool d'adénylates? Ce sera l'objet du paragraphe suivant.

## 2.2 Osmorégulation et métabolisme énergétique.

Les structures homogènes des branchies de crustacés nous donnent l'occasion d'analyser plus clairement et plus adéquatement que dans n'importe quels autres tissus épithéliaux le couplage du transport ionique actif à la production d'énergie cellulaire.

Plusieurs études ont confirmé l'étroite relation qui s'établit entre le métabolisme oxydatif et l'activité de transport via la pompe  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) \text{ATPase}$  dont les caractéristiques ont été présentées ci-dessus.

En 1970, Schoffeniels et Gilles démontrent que les besoins énergétiques nécessaires pour l'acclimatation à différents milieux dépendent essentiellement du métabolisme oxydatif, qui lui-même dépend de la consommation d'oxygène. De tous les facteurs impliqués de prime abord dans les variations de salinité du milieu environnant, les nucléotides adényliques et particulièrement l'ATP sont d'un intérêt particulier vu leur fonction de donneurs immédiats d'énergie pour les processus de transports actifs d'ions.

La production d'ATP à partir d'ADP via le système de transport des électrons nécessite de l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Le taux de conversion de l'ATP en ADP est directement proportionnel aux besoins énergétiques de l'activité cellulaire croissante, ce qui conduit à une augmentation concomitante de la consommation d'oxygène chez un tissu ou un organisme actif. Par conséquent, les taux de consommation d'oxygène seraient inversement proportionnels à la concentration en ATP dans les tissus branchiaux.

Plusieurs travaux permettent de confirmer cette corrélation négative et de montrer le lien évident entre la consommation d'oxygène branchiale et la salinité.

Les travaux d'Engel *et al.*, sur le crabe bleu *Callinectes sapidus*, ont permis de montrer que l'acclimatation affecte de manière significative les taux respiratoires des branchies antérieures à deux salinités différentes, ce qui n'est pas le cas des branchies postérieures. De plus, en considérant chacune des branchies comme une unité expérimentale, ils ont constaté que le taux respiratoire et la concentration en ATP étaient fonction de la salinité et de la taille de la branchie; c'est ainsi qu'aux faibles salinités, les branchies prises individuellement montraient des taux de consommation d'oxygène plus élevés et des concentrations en ATP plus basses qu'à haute salinité [Dehnel, 1974 - Engel et Eggert, 1974].

Tableau 1: Effet de la variation de la salinité sur la quantité totale d'adénylates.  $\Sigma A^* = ATP + ADP + AMP$  dans les branchies antérieures (AG) et postérieures (PG) de deux crustacés décapodes euryhalins *Carcinus maenas* et *Eriocheir sinensis*.

	CARCINUS MAENAS		$\Sigma A^*$ ( $\mu M/MgDNA$ )	ERIOCHEIR SINENSIS		
	Anterior gills	Posterior gills		Anterior gills	Posterior gills	
<u>SW</u>	2.252 ± 0.647 N=8	3.919 ± 1.125 N=9		1.162 ± 0.468 N=8	2.546 ± 0.909 N=9	<u>SW</u>
<u>SW/3</u>	1.777 ± 0.642 N=8	2.315 ± 0.259 N=6		1.733 ± 0.988 N=7	3.944 ± 1.501 N=9	<u>FW</u>

valeurs moyennes de n expériences ± S.D. (d'après Wanson et al., 1983)

Tableau 2: Effet de la salinité sur la charge énergétique (A.E.C) des branchies antérieures (AG) et postérieures (PG) de *Carcinus maenas* et *Eriocheir sinensis*.

	CARCINUS MAENAS		A.E.C.	ERIOCHEIR SINENSIS		
	Anterior gills	Posterior gills		Anterior gills	Posterior gills	
<u>SW</u>	0.873 ± 0.092 N=9	0.911 ± 0.031 N=9		0.874 ± 0.042 N=9	0.929 ± 0.024 N=9	<u>SW</u>
<u>SW/3</u>	0.907 ± 0.023 N=6	0.832 ± 0.031 N=6		0.917 ± 0.039 N=9	0.751 ± 0.069 N=9	<u>FW</u>
T-TEST	-	*		-	*	

valeurs moyennes ± S.D. de n expériences \* significatif à 1%  
A.E.C. =  $ATP + 0,5 ADP / ATP + ADP + AMP$   
(d'après Wanson, 1983 ; Wanson et al., 1983)



Ces données démontrent une étroite corrélation négative entre ces deux composantes. Une telle relation n'est envisageable que si la phosphorylation oxydative et la chaîne des transporteurs d'électrons situées au niveau des mitochondries sont impliquées dans l'osmorégulation.

Les taux respiratoires qui s'élèvent pourraient donc être directement liés à l'augmentation des concentrations observées des enzymes participant au cycle de l'acide citrique [Engel et al., 1975].

D'autres études plus détaillées abordant le contenu énergétique en fonction de la salinité du milieu d'adaptation, dans les branchies de deux crabes euryhalins *Carcinus maenas* et *Eriocheir sinensis* révèlent d'autres faits particulièrement intéressants [Wanson, 1983 - Wanson et al., 1983]: (figures 11a et 11b)

- Chez les deux crabes, la quantité totale d'adénylates peut atteindre 6µM/mg d'ADN, avec une grande différence de concentration entre les divers nucléotides suivant les milieux d'acclimatation.

- Quelle que soit la salinité du milieu, un taux significativement plus élevé d'adénylates a été mesuré dans les trois paires de branchies postérieures.

- Chez *Eriocheir sinensis*, l'acclimatation à un milieu dilué (eau douce) entraîne une augmentation de ce pool d'adénylates alors que chez *Carcinus maenas*, cette adaptation a l'effet inverse. D'autre part, on constate une diminution de la charge énergétique chez les deux espèces, uniquement dans les branchies postérieures.

La charge énergétique est définie selon Atkinson (1977) comme étant le rapport suivant:

$$\text{A.E.C} = \frac{\text{ATP} + 0,5 \text{ ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

L'A.E.C, la charge énergétique des nucléotides adényliques, fournit une estimation de la fraction du système des adénylates accessible sous forme d'ATP pour fournir du travail. Dans ce contexte, les données relatives à l'A.E.C suggèrent que l'utilisation d'ATP surpasse significativement la production

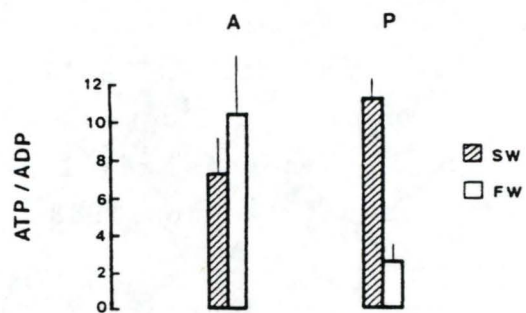


Figure 11b: Rapport ATP/ADP dans les branchies postérieures et antérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau de mer ou à l'eau douce.

d'ATP dans les branchies postérieures de crabes faisant face à un stress osmotique. Ceci est en parfait accord avec l'idée que seules les branchies postérieures du crabe chinois acclimaté à l'eau douce peuvent pomper activement du  $\text{Na}^+$ . Le fait que la chute observée dans la charge énergétique est plus importante chez *Eriocheir sinensis* que chez *Carcinus maenas* peut être mis en relation avec leurs potentialités écophysiologiques différentes et le milieu dans lequel ils ont été acclimatés. En effet, le crabe chinois, étant un hyperosmorégulateur puissant, a été adapté à l'eau douce pour les expériences; alors que le crabe vert, un hyperrégulateur plus modéré, a été adapté à un milieu "Sea water"/3. On retire de ces études que l'acclimatation apparaît donc comme un stress hypoosmotique nettement plus drastique pour le crabe *Eriocheir* que pour le crabe *Carcinus* et met en place des voies métaboliques produisant l'ATP mais incapable de ramener l'A.E.C à son niveau initial. Les variations observées dans l'A.E.C au sein des branchies sont en accord avec le fait que l'adaptation en milieu dilué de crabes hyperosmorégulateurs mène à une augmentation de l'activité ionique, associée à une chute de la charge énergétique, cette baisse entraînant à son tour une augmentation du métabolisme oxydatif et de la consommation d'oxygène. Par ailleurs, une activité plus élevée de la cytochrome c oxydase a été mesurée dans les branchies du crabe *Carcinus maenas* adapté à de faibles salinités. Ce changement semble également affecter significativement les branchies postérieures. Cette modification est indicative d'une adaptation mitochondriale lors de ce stress ionique [Welcomme et Devos, 1988].

Ces résultats mettent aussi en exergue la nécessité d'une optimalisation du métabolisme des adénylates dans les branchies postérieures lors d'une faible demande en énergie. C'est ce qui se passe lorsque ces animaux sont placés en eau de mer. De fait, dans ces conditions, les pompes ioniques fonctionnent encore pour maintenir la concentration ionique de l'hémolymphe mais leurs activités sont minimales dans cette situation proche de l'isotonie entre l'hémolymphe et le fluide extracellulaire.

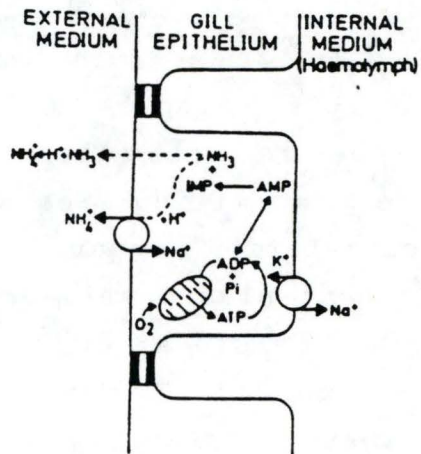


Figure 12: Couplage entre les mécanismes de transport ionique, le métabolisme énergétique et le pool d'adénylates dans les cellules épithéliales de branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* vivant en eau douce. (d'après Péqueux et al., 1988).

### 2.3 Conclusions.

Nous venons de voir l'existence chez les crustacés d'un mécanisme de couplage entre le métabolisme oxydatif, la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase et le pool des adénylates. Ce phénomène a déjà été décrit pour les branchies de poissons par Leray (1984) : lors de l'adaptation aux milieux de salinités différentes, l'ATP nécessaire à l'activité de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase est fourni par la respiration mitochondriale. Le catabolisme de cet adénylate produit d'une part l'ADP qui peut agir par feedback positif sur la respiration et d'autre part l'AMP qui, lui, se transforme en IMP et en  $\text{NH}_3$  par l'action d'une déaminase. Le groupement  $\text{NH}_3$  résultant interviendra sous forme d'ions  $\text{NH}_4^+$  dans l'ionorégulation (voir figure 12).

On constate de manière générale une augmentation du rythme respiratoire c'est-à-dire de la consommation d'oxygène lorsque les animaux osmorégulent. Cette augmentation est principalement due à une demande accrue d'énergie pour le processus de régulation ionique. Ainsi chez *Eriocheir sinensis* et chez *Callinectes sapidus*, il est plus élevé dans les branchies postérieures que dans les antérieures [Engel et al., 1975-Hayette, 1990]. Les principaux travaux qui ont été mentionnés au cours de ce chapitre concernant un certain nombre d'espèces de crustacés sont en faveur du modèle établi par Leray : le transport d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  est bien couplé au pool d'adénylates. De plus, la quantité d'ATP intracellulaire ainsi que son turn-over varie avec l'origine de la branchie et est fonction de la salinité à laquelle sont soumises ces branchies provenant de crabes aux performances écophysologiques différentes, comme l'ont montré les études de Schoffeniels et Gilles (1970), d'Engel (1975) et de Wanson (1983).

Lorsqu'un organisme est en pleine activité, la quantité d'oxygène fournie par l'hémolymphe peut être insuffisante pour satisfaire aux besoins des tissus car il peut y avoir saturation des transporteurs d'oxygène. Face à ce problème, les animaux ont recours à des modifications du débit sanguin qui leur assure un apport accru d'hydrates de carbone vers les tissus qui en ont le plus besoin, en l'occurrence ici les branchies

postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*. L'apport énergétique assuré par la glycolyse permet la survie des organismes, mais cela nécessite la mise en place de mécanismes de régulation très élaborés que nous allons aborder dans le chapitre III.

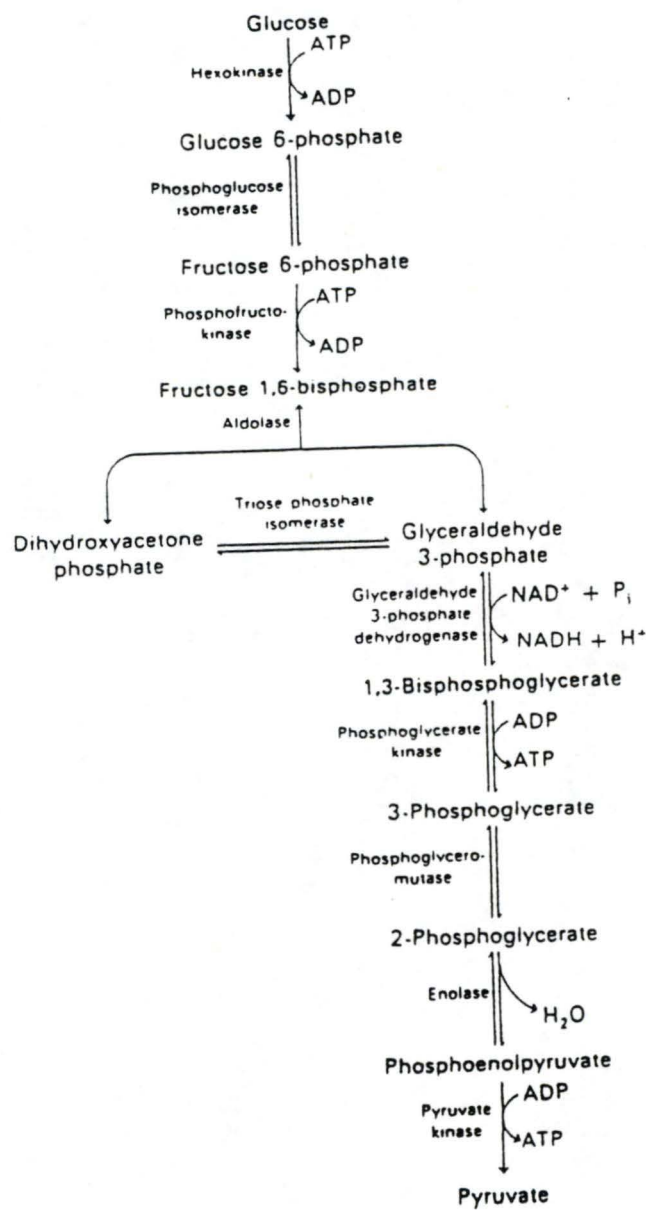


Fig 13: Voie glycolytique ou voie d'Embden-Meyerof.

# CHAPITRE III

## LE FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATE ET SON ROLE DANS LA REGULATION METABOLIQUE.

### 1. Rappel de la glycolyse.

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof est l'ensemble des réactions qui transforment le glucose en pyruvate (fig 13). Elle se déroule dans le 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 d'énergie libre. Ces trois étapes, catalysées respectivement par l'**hexokinase**, la **phosphofructokinase** et la **pyruvate kinase** constituent les haut-lieux de la régulation métabolique. Toutefois, un des trois enzymes cités ci-dessus va retenir tout particulièrement notre attention: la **phosphofructokinase**. Cet enzyme catalyse la réaction suivante:



L'enzyme est un tétramère d'un poids moléculaire d'environ 340 kD, composé de plusieurs types de sous-unités; il existe divers isozymes de la phosphofructokinase (PFK) qui présentent cependant des propriétés cinétiques assez semblables. On peut d'ailleurs caractériser cinétiquement la PFK par son inhibition pour un excès d'ATP et par sa forme sigmoïde de sa courbe de saturation pour le fructose-6-phosphate (fig 14). Ces deux effets peuvent disparaître sous l'effet de régulateurs allostériques positifs. L'ATP qui est un des substrats de la réaction se comporte, lui, comme un effecteur allostérique négatif; il induit une coopérativité pour le Fru-6-P, l'autre substrat.



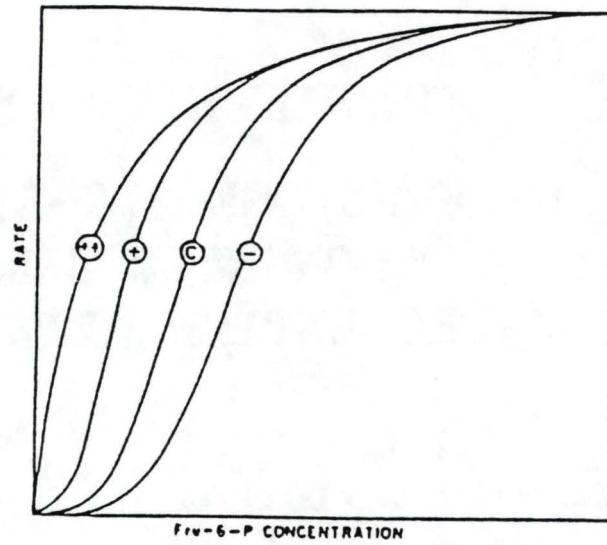


Fig 14: Représentation schématique de l'effet des activateurs et des inhibiteurs de la PFK-1 sur la courbe de saturation du Fru-6-P (d'après Ramaiah, 1974).

-: Inhibiteurs

c: Absence d'effecteurs

+: Effecteurs positifs (désinhibiteurs)

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

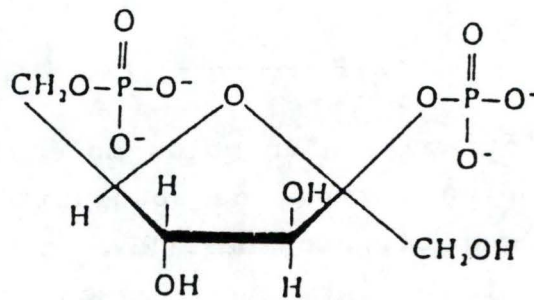


Fig 15: structure du  $\beta$ -D-Fructofuranoside 2,6 bisphosphate. (d'après Van Schaftingen, 1984)

Cette inhibition peut être ainsi levée en augmentant la concentration en modulateurs positifs qui agissent en synergie. C'est le cas pour :

- le 5'AMP, qui se lie à un site spécifique différent de l'ATP.
- l'AMP cyclique.
- le fructose-6-phosphate.
- **le fructose-2,6-bisphosphate.**

La présence de ces deux sites permet d'expliquer le rôle primordial joué par cet enzyme. En effet, la PFK ajuste la mobilisation énergétique aux dépenses et maintient la quantité de nucléotides à haute énergie. Une grande quantité d'AMP liée à une dépense énergétique élevée va activer l'enzyme pour assurer à l'organisme une réserve suffisante d'ATP.

## 2. Importance du fructose-2,6-bisphosphate.

L'étude réalisée au cours de ce mémoire s'inscrit dans l'approfondissement de la compréhension du métabolisme énergétique du crabe chinois acclimaté à l'eau douce, c'est-à-dire à un milieu hyposalin. C'est pourquoi nous allons nous focaliser sur l'un des plus puissants activateurs de l'enzyme-clef de la glycolyse chez les vertébrés, qui a été signalé ci-dessus à savoir le **fructose-2,6-bisphosphate** [Kitajima et al., 1983 - Hofer, 1985]. Ce petit métabolite encore inconnu chez ceux-ci il y a une dizaine d'années, intervient de manière capitale dans la régulation de la PFK-1 (fig 15) et à travers elle sur le flux glycolytique et donc sur la respiration cellulaire. D'après ce qui a été dit dans le chapitre précédent, on comprend aisément les tenants et les aboutissants de ce travail :

1) établir les sources énergétiques possibles mises à la disposition du crabe chinois lors d'une adaptation à un milieu hypoosmotique.

2) établir un lien définitif entre le transport ionique et la glycolyse chez les crustacés.

Le fonctionnement de la glycolyse est maintenant bien connu chez les crustacés. Il ressort de plusieurs travaux réalisés à ce propos [Boulton et Huggins, 1970 - Thabrew et Munday, 1971] que tous les enzymes présents chez les vertébrés se retrouvent chez les crustacés et que leurs mécanismes régulateurs sont similaires. De plus le travail récent de Mellouki (1990) a permis de vérifier l'existence du **fructose-2,6-bisphosphate** dans les tissus branchiaux du crabe *Eriocheir sinensis*. De plus, il a pu montrer une différence significative entre les branchies antérieures et les branchies postérieures, ces dernières ayant une plus forte concentration en ce métabolite. Ces résultats peuvent se comprendre quand on se rappelle le rôle osmorégulateur primordial de ce tissu branchial. En effet, Péqueux et Gilles (1981) ont montré que la branchie postérieure est le lieu d'action d'un grand nombre de pompes ioniques actives, nécessitant de l'énergie. Or 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 préalablement l'activer. Cela se réaliserait notamment par une stimulation plus importante de la PFK-1. Comme cet enzyme-charnière de la glycolyse est fortement activé par le Fru-2,6-bP, on comprend le rôle capital joué par cet ester phosphorique dans la synthèse d'ATP.

Il ne faut pas perdre de vue que le rôle de la glycolyse ne se limite pas exclusivement à la récupération d'énergie d'oxydation du glucose en pyruvate sous forme d'ATP. La glycolyse participe également à d'importants processus biosynthétiques. Le mode d'action du Fru-2,6-bP sur la PFK-1 le rend particulièrement bien adapté pour contrôler cette fonction anabolique de la glycolyse.

### 3. Caractéristiques du Fru-2,6-bP.

Le Fru-2,6-bP, activateur puissant de la PFK du foie, des muscles, de certaines glandes et des branchies, se retrouve chez de nombreux animaux, plantes et champignons [Van Schaftingen et al., 1980 a et b - Van Schaftingen, Hue et Hers, 1980 - El-Maghrabi, 1981 - El-Maghrabi et al., 1982a et b]. Il joue un rôle

régulateur sur d'autres enzymes telles que sont la fructose-1,6-bisphosphatase, la pyruvate kinase et une phosphofructokinase dépendante du pyrophosphate (P<sub>Pi</sub>-PFK). Cette enzyme spécifique aux plantes, encore appelée Fructose-2,6-phosphate-1-phospho-transférase, catalyse la réaction suivante:



Elle a été découverte par Reeves (1976) chez *Entamoeba histolytica* et est présente chez toutes les plantes et chez certaines bactéries. Seul l'enzyme de plante est stimulé par le fructose-6-phosphate. Ce dernier augmente l'affinité de l'enzyme pour le P<sub>Pi</sub>. La sensibilité de la P<sub>Pi</sub>-PFK au Fru-2,6-bP est fonction des conditions de dosage. Ainsi le K<sub>a</sub> pour l'activateur est diminué de 2 à 3 fois lorsque 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, la P<sub>Pi</sub>-PFK des tubercules de pomme de terre est extrêmement sensible au Fru-6-P. Son K<sub>a</sub> atteint 1nM. Cette propriété a été mise en évidence pour le dosage du Fru-2,6-bP [Van Schaftingen, 1984].

#### 4. Synthèse et dégradation du Fru-2,6-bP.

La synthèse du Fru-2,6-bP à partir de Fru-6-P et d'ATP est catalysée par la 6-phosphofructokinase-2 (PFK-2). Dans les conditions normales, l'enzyme n'est pas saturé par son substrat, le Fru-6-P. L'hydrolyse du Fru-2,6-bP en Fru-6-P et phosphate inorganique est catalysée par une phosphatase spécifique, la fructose-2,6-biphosphatase (FBPase-2). Cet enzyme est normalement saturé par son substrat, le Fru-2,6-bP. Cependant, le Fru-6-P, un produit de la réaction, inhibe la FBPase-2 avec une constante d'inhibition (K<sub>i</sub>) égale ou supérieure à la concentration cellulaire en Fru-6-P [Van Schaftingen et Hers, 1981]. Par conséquent, tout changement dans la concentration en Fru-6-P doit provoquer des changements dans le même sens de la concentration en Fru-2,6-bP.

On a de fait pu montrer l'existence d'une relation directe entre ces deux paramètres [Hue, 1987 - Hue et Rider, 1987].

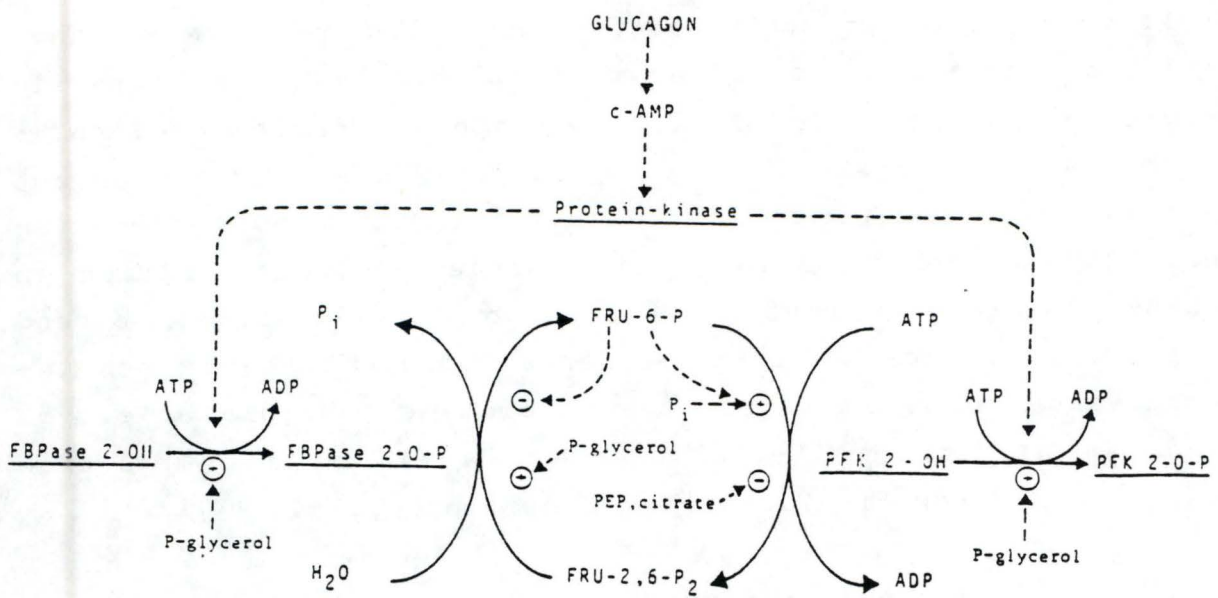


Fig 16: Biosynthèse et biodégradation du fructose-2,6-bisphosphate dans le foie de rat et leur contrôle par le glucagon et les métabolites ( d'après Hers et Van schaftingen, 1982).

La concentration du Fru-2,6-bP est contrôlée par l'activité relative de la PFK-2 et de la FBPase-2. Dans le foie, un facteur essentiel du contrôle semble être la phosphorylation de l'ensemble PFK-2/FBPase-2 par la protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique, phosphorylation qui entraîne l'activation de la FBPase-2 et l'inhibition de la PFK-2, ce qui provoque une baisse du taux de Fru-2,6-bP. Par ce mécanisme, la glycolyse et la néoglucogenèse sont sous le contrôle de l'AMP cyclique et donc d'hormones agissant sur l'adénylate cyclase [Hers et Van Schaftingen, 1982]. Par contre, dans le muscle, l'absence de phosphorylation de la PFK-2/FBPase-2 par une protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique semble signifier que le Fru-2,6-bP échappe au contrôle direct via ce nucléotide cyclique. La PFK-2 et la FBPase-2 peuvent cependant être modulées par d'autres métabolites de la même façon que dans le foie [Van Schaftingen, 1986] (figure 16).

### 5. Rôle du Fru-2,6-bP dans la régulation métabolique.

On vient de voir que la concentration cellulaire du Fru-2,6-bP est contrôlée par l'activité relative de deux enzymes, la PFK-2 et la FBPase-2, eux-mêmes soumis à différents effecteurs et à des modifications covalentes. Dans le foie de rat, l'activation de la FBPase-2 par une protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique favorise la disparition du Fru-2,6-bP. Par contre, chez la levure, cela conduit à l'augmentation de sa concentration. La propriété générale du Fru-2,6-bP est de stimuler la PFK-1 et d'inhiber la FBPase-1

#### 5.1 Dans le foie de rat.

Etant donné que cet organe est le modèle qui a été le plus étudié, nous nous y référons tout spécialement dans ce qui suit.

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 (après un repas par exemple), il est transformé en glycogène et en graisses.

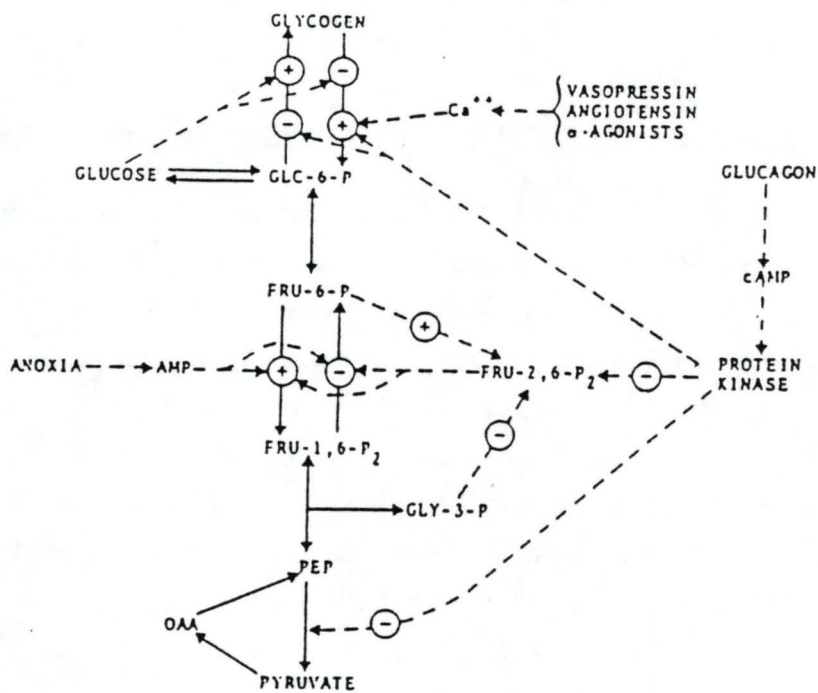


Fig 17: Régulation du métabolisme des carbohydrates dans le foie par le glucose et les hormones.  
 Abréviations: PEP = phosphoenolpyruvate; Gly-3-P = glycérol 3-phosphate ( d'après Van Schaftingen et al., 1982).

Le glucose intervient dans le métabolisme du glycogène, en causant l'inactivation de la phosphorylase et, secondairement, l'activation de la synthase. Pour la glycolyse et la néoglucogénèse, les effets du glucose sont contrôlés par les variations de concentration en hexose-P et en Fru-2,6-bP [Claus *et al.*, 1984]. Ce système est sous contrôle hormonal, faisant intervenir le glucagon, des agents  $\beta$ -adrénergiques comme la noradrénaline, des agents  $\alpha$ -adrénergiques, enfin l'AMP cyclique et le  $\text{Ca}^{++}$  [Van Schaftingen, 1985 - Wals, Palacin et Watz, 1988]. (figure 17)

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 néoglucogénèse. Après nutrition, la synthèse de glycogène réapparaît en quelques minutes et le taux de Fru-2,6-bP qui reste bas dans les premières heures, atteint une valeur maximale après 5 heures. La vitesse élevée à laquelle le glucagon est sécrété maintient probablement la concentration en hexose-P et prévient ainsi la formation de Fru-2,6-bP jusqu'à ce que les réserves de glycogène soient reconstituées [Van Schaftingen, 1986].

Le glucagon induit dans le foie plusieurs modifications 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'AMP cyclique issue de l'activation de l'adénylate cyclase et modulant l'activité de la protéine kinase A. D'autres agents ou conditions provoquent une augmentation de la concentration en AMP cyclique induisant de la sorte une diminution de la concentration en Fru-2,6-bP [Kuucijima et Uyeda, 1982 - Kitamura *et al.*, 1988].

Sur des préparations isolées de foie, l'insuline a une action antagoniste à celle du glucagon. Son effet sur l'activité de la PFK-2/FBPase-2 et sur le taux de Fru-2,6-bP est le contraire de celui du glucagon.



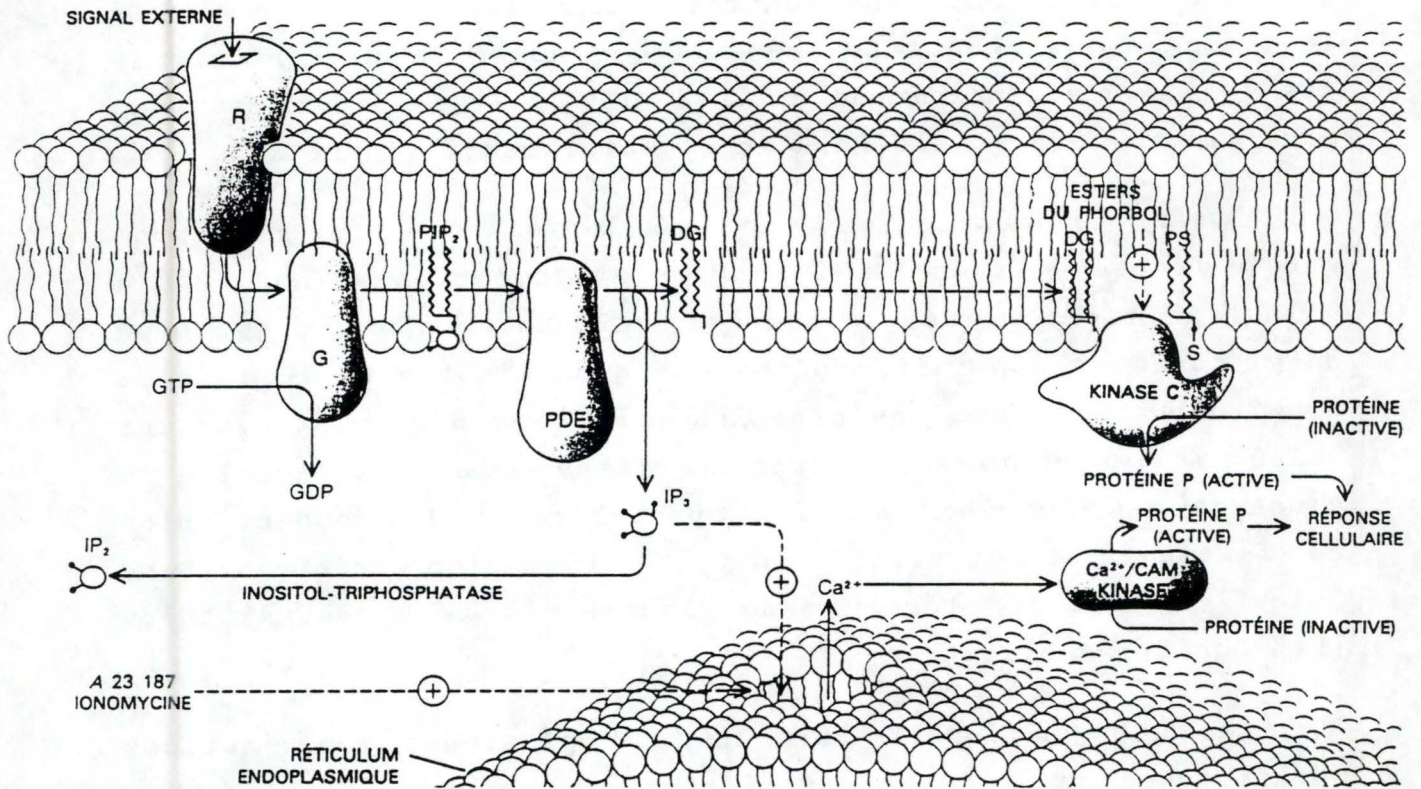


Fig 18: Modèle d'activation de la protéine kinase C.

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

( d'après Berridge, 1985 )

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 comme conséquence une concentration accrue en Fru-2,6-bP. [ Probst et Fechner, 1985 - Sale *et al.*, 1987 ]

D'autres substances telles les esters de phorbol et des substances mitogéniques provoquent aussi des variations de la concentration en Fru-2,6-bP. L'O.A.G. (Oléyl, acétyl glycérol) par exemple provoque une élévation du taux de Fru-2,6-bP dans les lymphocytes de la rate. Ces esters de phorbol qui miment l'action du diacylglycérol intracellulaire agissent eux via l'activation de la protéine kinase C sans affecter la concentration interne en calcium. Un des changements le plus rapide après l'exposition des lymphocytes aux esters de phorbol actifs est la translocation en membrane de la protéine kinase C, ce qui provoque son activation. Simultanément, la mobilisation du  $Ca^{++}$  et la translocation de l'enzyme stimulent la croissance des lymphocytes [Boxa, Mojena et Marquez, 1988]. (figure 18)

### 5.2 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 P<sub>Pi</sub>-PFK. L'illumination de feuilles d'épinards cause une augmentation de la concentration en Fru-2,6-bP d'un facteur 2, puis son taux revient à son niveau initial après quelques heures [Mertens, Van Schaftingen et Hers, 1987].

Le Fru-2,6-bP pourrait jouer un rôle dans l'orientation de la photosynthèse vers la production d'amidon dans les chloroplastes 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 [Larondelle, Mertens, Van Schaftingen et Hers, 1989 - Enemoto *et al.*, 1989].

### 5.3 Dans la levure.

Il apparaît maintenant que, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'AMP cyclique est le second messenger du glucose, lequel en induisant la phosphorylation de la FBPase-1 et la formation du Fru-2,6-bP, stimule la glycolyse par stimulation concomitante de l'activité de l'hexokinase [François, Van Schaftingen et Hers, 1984]. Cependant, le glucose provoque aussi une activation de la PFK-2 via la même voie. Cette activation semble ainsi 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 AMP cyclique est bloquée 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 [François, Eraso et Gancedo, 1987 - Kretschmer et al., 1987].

L'anoxie cause aussi une augmentation de la concentration en Fru-2,6-bP 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 [Van Schaftingen, 1986].

### 5.4 Dans d'autres tissus.

#### 5.4.1 les muscles striés.

-----

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 [Uyeda et al., 1982].

Dans le coeur 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 coeur perfusé, le taux de Fru-2,6-bP n'est pas affecté par l'adrénaline et on observe pas d'augmentation de l'activité de la PFK et de stimulation du flux glycolytique [Van Schaftingen et al., 1986 - Hue et al., 1982].

#### 5.4.2 le tissu adipeux.

-----

On observe ici soit une diminution, soit une augmentation de la concentration en Fru-2,6-bP dans les adipocytes isolés, alors que l'effet d'hormones comme le glucagon ou la noradrénaline est connu comme stimulateur de la glycolyse. On ne peut donc ici établir un lien étroit entre cette voie métabolique et le Fru-2,6-bP [Sale et Denton 1985 a et b - Van Schaftingen *et al.*, 1986].

#### 5.4.3 les tissus d'invertébrés non arthropodes.

-----

Le rôle du Fru-2,6-bP sur le métabolisme des invertébrés est seulement étudié depuis quelques années. Les premiers travaux font état d'une activation de la PFK du muscle des ailes du cafard *Péripáneta americana* par cet ester bisphosphaté. On constate de fait une augmentation de ce Fru-2,6-bP durant la phase d'initiation de l'envol de l'insecte [Storey, 1983 et 1985].

La capacité de survivre à de longues périodes d'anoxie est une nécessité prioritaire pour la majorité des espèces d'invertébrés marins qui séjournent dans la zone intertidale. Ces conditions extrêmes exigent de la part des organismes des adaptations adéquates. Manifestement, le contrôle du taux glycolytique est requis pour ce genre de situation. L'étude réalisée par Storey (1985b) examine à ce propos les contenus tissulaires en Fru-2,6-bP de trois espèces de mollusques marins, *Mytilus edulis*, *Littorina littorea* et *Ostrea edule*, adaptées à un milieu anoxique pendant une période déterminée. Les résultats suggèrent qu'une diminution précoce du taux de Fru-2,6-bP dans les tissus mous (branchies, manteau, hépatopancréas) peut être impliquée dans un processus d'économie des hydrates de carbone, ceux-ci servant à d'autres fins que la production d'énergie durant l'anaérobiose. Cette réduction de l'activité métabolique dans un environnement sans oxygène est apparemment la raison principale pour laquelle aucun effet Pasteur n'est observé chez ces animaux aquatiques.

L'anaérobiose chez ceux-ci est caractérisée par [Storey, 1984 et 1988]:

- aucun changement dans le pourcentage de la phosphorilase a.

- une phosphorylation et une activation de la pyruvate kinase et de la PFK.

- une modification de la concentration en Fru-6-P et en Fru-1,6-bP, indicatrice d'une inhibition de la PFK.

Cette situation est assez similaire à celle que l'on rencontre dans les hépatocytes et lors d'une stimulation électrique d'un muscle; la diminution effective de la concentration en Fru-2,6-bP dans les tissus mous entraînerait une réduction de la demande énergétique et par là une abolition des processus anaboliques. Une légère augmentation du contenu en AMP dans ces tissus, pendant l'anaérobiose peut dès lors devenir le mécanisme modulateur principal dans le contrôle du flux glycolytique en fonction des exigences énergétiques.

D'un autre côté, on remarque que le contenu du Fru-2,6-bP dans les muscles adducteurs des bivalves reste constant, alors que dans le muscle du pied des gastéropodes, il augmente. Ici, la situation est quelque peu différente. De fait, la concentration en Fru-2,6-bP doit se maintenir ou même augmenter pour promouvoir la fonction musculaire durant l'anoxie. Ceci confirme les résultats antérieurs observés chez les insectes et chez le buccin marin *Busycotypus canaliculatum*. Cependant, si ce métabolite se maintient, son influence sur la PFK peut réellement diminuer pendant l'anoxie. En effet, comme souligné ci-dessus, l'anoxie induit la phosphorylation de deux enzymes; la forme phosphorylée (en anoxie) montre une sensibilité réduite au Fru-2,6-bP et une sensibilité croissante à l'inhibition par l'ATP [Storey, 1984].

En conclusion, si une modification covalente peut aussi s'appliquer aux tissus mous, alors l'activité de la PFK peut être déprimée par trois mécanismes:

- (1) la phosphorylation des enzymes, ce qui les rendent moins actives.

(2) des concentrations décroissantes en modulateurs allostériques, ce qui limite l'utilisation anabolique des hydrates de carbone durant les périodes de métabolisme réduit.

(3) la dissociation des enzymes des complexes reliées à la fraction particulaire subcellulaire, ce qui rompt les voies de passage des flux.

#### 5.4.4 le tissu branchial des crustacés.

Au cours du travail qui a permis l'identification du Fru-2,6-bP dans le tissu branchial des crustacés, on a pu mettre en évidence une modulation de sa concentration dans les branchies postérieures du crabe chinois acclimaté à l'eau douce. En effet, la perfusion de ces branchies avec de l'O.A.G ou du dibutyryl AMP cyclique augmente la concentration du Fru-2,6-bP d'un facteur 2, ce qui laisse supposer un contrôle hormonal de la glycolyse chez ce crabe hyperosmorégulateur. L'AMP cyclique, par exemple, peut venir se fixer sur la sous-unité régulatrice d'une protéine kinase A, ce qui libère la sous-unité catalytique qui peut alors phosphoryler un grand nombre de protéines dont le système PFK-2/FBPase-2. Cette cascade de réactions aboutit ainsi à l'augmentation du taux de Fru-2,6-bP dans les branchies "transportrices". On peut faire le même raisonnement avec l'O.A.G mais dans ce cas, c'est une protéine kinase C qui est stimulée.

La signification physiologique d'une telle régulation par modification covalentes (phosphorylation/déphosphorylation) chez les crustacés est actuellement en plein débat. Mais ceci constitue une nouvelle voie d'approche dans la compréhension du contrôle du métabolisme énergétique chez ces arthropodes.

#### 5.5 Conclusion: le Fru-2,6-bP, signal glycolytique.

Actuellement, le Fru-2,6-bP est le candidat par excellence pour stimuler la PFK-1 lorsque la fonction anabolique de la glycolyse est prépondérante.

On peut le définir par deux caractéristiques principales qui sont de surcroît complémentaires:

a) Le Fru-2,6-bP est actif à des concentrations micromolaires qui correspondent aux taux normalement trouvés dans les cellules.

b) Le Fru-2,6-bP est un pur régulateur et non un métabolite intermédiaire de la voie glycolyse/gluconéogenèse. Il se comporte comme un intégrateur qui concentre en un seul point de contrôle, la **phosphofructokinase-1**, une série d'informations provenant de divers métabolismes [Van Schaftingen et al., 1986].

Ces deux propriétés, en plus de la caractéristique d'acidolabilité, font que ce métabolite aussi simple fut découvert si tard [Van Schaftingen, Hue et Hers, 1980b].

Le Fru-2,6-bP représente donc un signal moléculaire véhiculant une série d'informations intra-cellulaires et extra-cellulaires. Ces dernières font intervenir l'AMP cyclique qui, dans le foie et la levure, constitue un signal de situation nutritionnelle. Bien que le Fru-2,6-bP et ce nucléotide cyclique sont des signaux présents très tôt dans l'évolution, leur phylogenèse n'en est pas moins différente puisque le Fru-2,6-bP est trouvé dans les plantes mais pas chez les procaryotes, au contraire de l'AMP cyclique. De plus, la fonction du Fru-2,6-bP ne semble pas avoir été modifiée, ce qui n'est pas le cas pour l'AMP cyclique; l'ester phosphorique stimule la glycolyse et inhibe la néoglucogenèse (par exemple dans le foie et chez la levure).

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 néoglucogénique. Cela s'observe lors de la remise en route des activités métaboliques dans 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 [Mertens, Van Schaftingen et Hers, 1987].

### CONCLUSIONS GENERALES.

# Les expériences réalisées jusqu'à ce jour ayant comme ligne directrice le lien entre le métabolisme énergétique des branchies et l'activité de transport ionique ont tenu toutes leurs promesses même si les bases moléculaires des processus impliqués restent encore assez imprécises. De bonnes corrélations ont été établies, chez *Eriocheir sinensis* et d'autres espèces euryhalines, entre l'ultrastructure de l'épithélium branchial, révélée par microscopie électronique, leurs propriétés de transport et leurs caractéristiques biochimiques.

# Certains travaux ont mis l'accent sur la partie prépondérante jouée par les branchies dans le contrôle de la composition des fluides internes, et ont établi l'existence d'une sorte de spécialisation de cette fonction. Les branchies localisées postérieurement dans la chambre branchiale chez les hyperosmorégulateurs euryhalins, tels que *Eriocheir sinensis*, semblent être les principales, mais pas les seules, responsables du pompage actif d'ions  $\text{Na}^+$  dans des milieux dilués.

# Cette prise active de sels implique une consommation énergétique importante, celle-ci étant soumise à plusieurs mécanismes régulateurs dont la plupart restent à découvrir. Il est en tout cas certain que les performances écophysiologiques auxquelles nous ont habitués les crustacés demande une parfaite coordination entre les branchies pour subvenir aux besoins de l'organisme en cas de stress hypoosmotique.

Dès lors, un système de transduction est nécessaire pour qu'un stimulus extérieur puisse pénétrer dans la cellule et y engendrer une réponse. C'est à ce niveau que nous avons considéré le rôle des bioamines dans cette communication cellulaire. Et c'est évidemment dans cette voie que nous allons engager notre travail dont l'orientation va être résumée ci-après.



## CHAPITRE IV

### ORIENTATION DU TRAVAIL

Ce travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude des modifications énergétiques concomitantes au maintien de l'homéostasie hydrominérale. Dans ce contexte, le crabe *Eriocheir sinensis* apparaît comme un modèle privilégié; il s'agit en effet d'une espèce euryhaline qui peut facilement s'adapter à de larges fluctuations de salinité du milieu extérieur.

Les branchies constituent un pôle d'intérêt pour toute étude concernant l'osmorégulation. Le crabe chinois, *Eriocheir sinensis*, se singularise d'autres espèces par le dimorphisme de ses six paires de branchies: trois d'entre elles, situées dans la région postérieure de la cavité thoracique sont étroitement impliquées dans le transport ionique alors que les branchies antérieures ne le sont quasiment pas. Des différences morphologiques, physiologiques et biochimiques entre ces deux types branchiaux témoignent de leur spécialisation. Il devient donc possible d'examiner sur le même animal, les modifications du métabolisme énergétique induites par l'activation du transport ionique tranépithélial.

Ce transport ionique nécessite de l'énergie qui doit être constamment renouvelée pour assurer un fonctionnement continu des pompes ioniques lorsque le crabe est acclimaté à l'eau douce. Dans ce cadre, nous pensons que la glycolyse est l'une des voies de production de cette énergie. Le contrôle de cette voie métabolique, aérobie ou anaérobie, est un mécanisme relativement complexe et fait intervenir un grand nombre d'effecteurs parmi lesquels le **fructose-2,6-bisphosphate** qui a pu être identifié dans les deux types de branchies du crabe chinois. Les études dans notre laboratoire ont pu par ailleurs montrer que l'AMP cyclique stimulent les pompes ioniques, et plus particulièrement le transport de  $\text{Na}^+$ .

D'autre part, lors d'une étude récente, Bianchini et Gilles (1990) ont démontré que l'AMP cyclique est impliqué dans le contrôle des mouvements tranépithéliaux de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  chez ce crabe, vraisemblablement par activation d'une part de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et d'autre part des canaux à chlorures localisés tous deux à la face sérosale de l'épithélium. Nous avons également voulu souligner les travaux qui mettent en évidence le lien entre l'équilibre hydrominéral et l'action des facteurs hormonaux [Scheide et Dietz, 1983 et 1986 - Zatta, 1987 - Mantel et Sommer, 1988], ce qui nous amène à nous intéresser d'un peu plus près au rôle des bioamines dans le contrôle du transport ionique.

Nous utiliserons à cet égard le modèle expérimental qu'est la branchie isolée et perfusée du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, qui représente un matériel très pratique pour ce type d'études.

C'est ainsi que, dans un premier temps, nous envisageons de perfuser les branchies de ces crabes avec des bioamines, telles que la dopamine et la sérotonine, afin de mettre en évidence l'effet de ces molécules sur le transport ionique chez le crabe chinois acclimaté à l'eau douce.

Il semble que le métabolisme intense des branchies postérieures est la conséquence d'une machinerie cellulaire différente et non celle d'une activation plus forte d'un métabolisme semblable à celui des branchies antérieures par des systèmes de régulation intracellulaire. C'est la raison pour laquelle nous nous intéresserons à des signaux cytosoliques tels que le taux de Fru-2,6-bP et l'état du système ATP/ADP lors de cette possible modulation du transport ionique par les bioamines.

Notre but sera en effet de montrer comment se comportent ces deux indicateurs métaboliques lorsque les branchies du crabe chinois seront perfusées en présence de solutions de composition saline différente ("FW" et "SW"), c'est-à-dire dans une situation où la branchie transporte ("FW") ou ne transporte pas ("SW").

# MATERIEL ET METHODES

LISTE DES PRODUITS UTILISES.

Acétate de magnésium	UCB,1424
Acide acétique glacial	UCB,1005
Acide borique	Merck,165
Acide chlorhydrique	Merck,A-317
Acide perchlorique	UCB,1064
Adénosine 5'-triphosphate(ATP)	Sigma,A-3377
Adénosine 5'-diphosphate(ADP)	Sigma,A-2754
Aldolase	Sigma,A-6253
Carbonate de potassium	Merck,4928
Chlorure de calcium	Merck,2382
Chlorure de magnesium	Merck,5833
Chlorure de potassium	Merck,4936
Chlorure de sodium	Merck,6404
Column PD-10 Sephadex G-25M	Pharmacia,17-0851-01
Fructose-2,6-bisphosphate	Sigma,F-7006
Fructose-6-phosphate	Sigma,F-3627
Fructose-6-phosphate kinase pyro- phosphate dépendant	Sigma,F-2258
GDH/TIM(Glycérol-3-P déshydrogénase/ Triose isomérase)	Boehringer,127-787
Hepes,99%[4-(2-hydroxyéthyl)-1- piperazine-ethane sulfonic acid]	Janssen Chemica,17- 257-88
Hydroxyde de potassium	UCB,1604
Hydroxyde de sodium	Merck,6498
5'-hydroxytryptamine(Sérotonine)	Janssen Chemica,13- 278-46
3'-hydroxytyramine-HCl(dopamine)	Sigma,H-8502
Kit lyophilisé(ATP ASSAY MIX)	Sigma,F-8190
Meldola blue (8-diméthylamine-2,3- benzophénoxazine)	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,2'-O-dibutyryladénosine 3'-5'- cyclic monophosphate	Sigma,D-0627

$^{22}\text{NaCl}$	Amersham SKS-1
Phosphoénolpyruvate (PEP)	Sigma,P-7252
Pyrophosphate tétrasodium anhydre	Sigma,P-9146
Pyruvate Kinase (PK)	Sigma,9645
SAB(sérum albumine bovine)	Merck,12018
SDS(sodium dodécylsulfate)	Merck,13760
Sulfate de magnesium	Merck,5886
TRIS[tris(hydroxyméthyl)aminoéthane]	Janssen Chemica,16- 762-78

# CHAPITRE I

## MATERIEL BIOLOGIQUE.

### 1. Intérêt des recherches sur les crustacés.

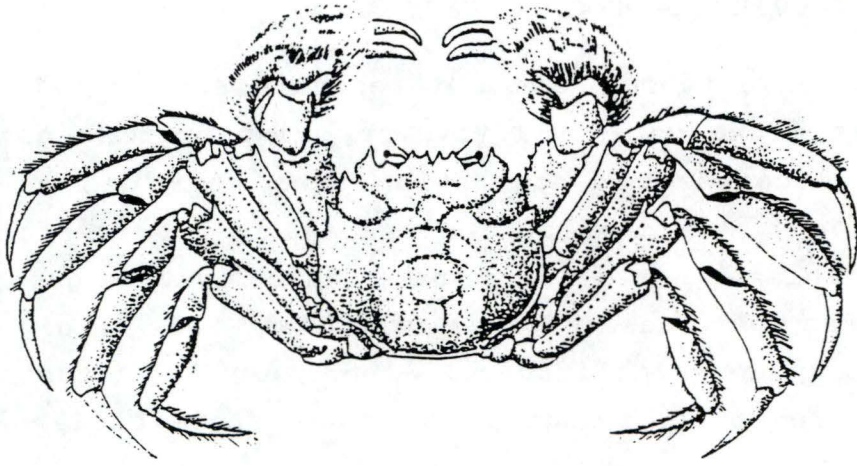
L'étude des invertébrés est intéressante; ces animaux se situent au sommet d'une voie évolutive, ce qui permet la comparaison de leurs mécanismes d'adaptation avec ceux des vertébrés. D'une part, on a une meilleure connaissance et compréhension de ces mécanismes et, d'autre part cela montre que les solutions adoptées par des espèces vivantes très éloignées présentent beaucoup de similitudes. L'étude sur les crustacés (35000 espèces) revêt une importance toute particulière en raison de :

# **leur intérêt économique:** les crustacés fournissent une nourriture riche en protéines et en acides gras insaturés, ce qui entraîne une pêche intensive de diverses espèces dont les plus connues sont la crevette, le homard, l'écrevisse, ...

L'élevage de crustacés en captivité, au sein d'écloseries dans des pays à forte densité de population, favorise une connaissance beaucoup plus approfondie de ces animaux.

# **leur intérêt biologique et écologique:** les crustacés occupent une place importante dans la chaîne trophique. Certaines espèces (amphipodes, isopodes, ...) constituent l'alimentation principale de nombreuses espèces de poissons. De plus de nombreux crustacés sont détritivores, ce qui leur permet de se situer en début et fin de la chaîne alimentaire (crabes *Uca* et *Scopimera*). Par ailleurs, les crustacés interviennent comme bioindicateurs en marquant mieux que les microorganismes les méfaits d'un agent polluant .

# **leur intérêt au point de vue industrie médicale:** La carapace de crustacés est constituée de chitine, polymère de N-acétyl-glucosamine, pouvant se transformer en chitosan. Ce dernier fournit des filaments capables de ligaturer des plaies, sans provoquer de réactions de rejet de la part de l'organisme, ni d'allergie puisque les produits sont résorbables par l'animal lui-même.



*Eriocheir sinensis.*

Figure 1: *Eriocheir sinensis* (d'après Bauchau, 1966)

Comme la chitine constitue également un très bon milieu de culture pour le développement de bactéries hydrolysant le lactose (donc riches en lactases), son administration à des individus déficients en ces enzymes favorise une meilleure assimilation du lait.

Enfin, plusieurs espèces de crabes sont des vecteurs de parasites telles la douve pulmonaire du genre *Paragonimus* et du microfilaire *Onchocerca Volvulus*.

## 2. Description de l'animal et position systématique.

*Eriocheir Sinensis* (MILNE-EDWARDS, 1854) dont le nom commun est " crabe chinois ", est un arthropode crustacé malacostracé. Ses cinq paires de pattes et son abdomen caché sous le céphalothorax en font un décapode brachyoure. Il représente une des deux espèces de crabes 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 représente une teinte vert-gris et mesure environ 60 mm de large au niveau du bouclier céphalo-thorique (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 15°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Ils sont nourris deux 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 PREPARATOIRES

#### 1. Prélèvement des branchies.

Après avoir tué l'animal, le plus rapidement possible, on enlève le bouclier céphalo-thoracique dorsal. Les branchies apparaissent disposées latéralement dans les chambres branchiales. Elles sont isolées et soit congelées dans l'azote liquide ( $-84^{\circ}\text{C}$ ) pour les dosages, soit utilisées directement pour les perfusions. Dans ce cas, elles sont rapidement débarrassées du rachis calcifié pour être ensuite séchées sur papier filtre, pesées et découpées en morceaux en vue de l'homogénéisation.

#### 2. Traitement du tissu branchial.

##### 2.1 Pour le dosage du Fructose-2,6-bisphosphate.

-----

Les tissus branchiaux sont homogénéisés dans un volume de  $\pm$  1ml de NaOH 50mM (pour une branchie d'un poids de 50 à 100 mg) 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  $\pm$  10 passages du piston pendant 2x30 sec à 10 secondes d'intervalle. 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 est ensuite chauffé à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant cinq minutes (bain thermostatisé). Ce chauffage permet la destruction complète du Fru-6-P qui est le substrat de la PFK-1. L'échantillon est alors refroidi et centrifugé à 5000 x g pendant dix minutes (Sorvall RC 5, rotor SS-34). Ce premier culot, contenant les protéines dénaturées à la chaleur, est éliminé. Le surnageant est neutralisé par ajout d'acide acétique glacial 1M contenant de l'HEPES 20mM (pH=7,0).

Ce traitement provoque la précipitation des protéines restantes qui sont éliminées par une seconde centrifugation à 5000 x g pendant dix minutes. On récupère le surnageant contenant l'ester bisphosphaté. L'échantillon est utilisé pour le dosage le jour même ou est stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  si nécessaire.

## 2.2 Pour le dosage de l'ATP et de l'ADP.

-----

Le traitement des branchies se fait selon la méthode classique d'extraction à l'acide perchlorique [Jaworck *et al.*, 1974]. Quelques modifications y ont cependant été apportées.

L'extraction est réalisée sur le tissu branchial préalablement décongelé. Toute l'opération s'effectue à froid. Les branchies sont homogénéisées dans un potter de même type que celui utilisé dans le cas du Fru-2,6-bP, contenant 1 ml de  $\text{HClO}_4$  0,25M (pour une branchie d'un poids de 50 à 100 mgr). L'homogénéisation est réalisée par trois séries de cinq passages successifs du piston. Après décantation et rinçage avec 0,3 ml de  $\text{HClO}_4$  0,25M, on neutralise l'extrait avec 0,2 ml KOH 1,5M et on ajuste le pH à l'aide de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,5M (ou 2 gouttes de pipette Pasteur) de manière à arriver au pH optimum pour le dosage en bioluminescence, c'est à dire 7,4 à 7,8. Les tubes sont centrifugés à 3000 x g (IEC Centra - 4B) pendant trois minutes afin de sédimenter totalement les protéines et le  $\text{KClO}_4$  formés. Les surnageants sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment du dosage. Une centrifugation supplémentaire est réalisée sur chaque surnageant décongelé avant le dosage afin d'éliminer toute trace de précipité qui pourrait perturber la réaction de bioluminescence.

# CHAPITRE III

## TECHNIQUE DE PERFUSION DES BRANCHIES ET MESURE D'UN FLUX IONIQUE.

### 1.Principe.

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

### 2.Composition des solutions isotoniques.

#### 1) Ringer "Eau douce"(FW)

NaCl :	240 mM
KCl :	5 mM
MgCl <sub>2</sub> :	5 mM
CaCl <sub>2</sub> :	12,5 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	8,8 mM

#### 2) Ringer "Eau de mer"(SW)

NaCl :	480 mM
KCl :	10 mM
MgCl <sub>2</sub> :	10 mM
CaCl <sub>2</sub> :	25 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	8,8 mM

Le pH est ajusté à 7,6 avec une solution de TRIS M.

### 3.Mode opératoire.

Après avoir ôté la carapace céphalo-thoracique, chaque branchie est déposée dans la solution FW et l'hémolymphe résiduelle interne est expulsée par appui mécanique sur la branchie. Un cathéter est placé dans le vaisseau afférent et un autre dans le vaisseau efférent de la branchie. Ils sont fixés par une petite pince en plexiglas. La branchie est alors plongée dans un petit berlin contenant 15 ml de solution saline dénommée solution d'incubation ou solution "OUT".

Le cathéter fixé dans le canal afférent est connecté à une ampoule contenant la solution de perfusion ou solution "IN" enrichie ou non de plusieurs effecteurs du transport ionique (dibutyril AMPc, dopamine, sérotonine). Cette ampoule est située 15 cm au-dessus du récipient 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 tube en verre par l'intermédiaire du cathéter fixé dans le canal efférent.

Le milieu d'incubation est oxygéné, ce qui accroît la viabilité des branchies.

Une fois l'opération terminée (une perfusion dure suivant les expériences de 1h à 1h30), les branchies sont détachées de leur cathéter. Elles sont séchées à l'aide d'un papier filtre (type Schleicher & Schuell 597). Les dosages du fru-2,6-bP, de l'ATP et de l'ADP se réalisent sur une même branchie test; on sectionne donc celle-ci dans le sens de la largeur pour avoir deux parties quasiment semblables. Cette opération finie, les 1/2 branchies seront congelées dans l'azote liquide puis stockées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment des dosages respectifs.

#### 4. Mesure de la ddp (différence 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 ioniques. Cette ddp peut être mesurée au moyen de deux électrodes au calomel reliées par un pont d'agar. L'électrode de référence est plongée dans le récipient où est recueillie la solution de perfusion tandis que l'autre est placée dans la solution extérieure. Les deux électrodes sont connectées à un électromètre. La différence de potentiel est prise régulièrement (toutes les deux ou trois minutes) au cours des diverses expériences.

### 5. Mesure du flux entrant de $^{22}\text{Na}$

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

Le but de ces expériences est d'observer le flux d'un ion au travers d'un compartiment cellulaire. Un isotope radioactif de l'ion en question est placé, soit dans le milieu "In", soit dans le milieu "Out". Connaissant son activité spécifique (cpm/ $\mu\text{mole}$ ), la quantité d'ions transportés de la face interne vers la face externe ou l'inverse peut être ainsi calculée.

Dans notre expérience, on utilise le  $^{22}\text{NaCl}$  (Amersham SKS-1) à 0,2  $\mu\text{Ci/ml}$  placé dans le berlin où baigne la branchie. De cette façon, on étudie le transport des ions  $^{22}\text{Na}$  de la face externe vers la face interne en prélevant toutes les cinq minutes dans une fiole 0,5 à 2,5 ml de solution de perfusion. Nos échantillons sont ensuite placés dans un compteur à scintillation  $\beta$  type Beckmann LS 6000 IC pour détecter l'ion radioactif transporté (Note: le  $^{22}\text{Na}$  ne nécessite pas de liquide scintillant).

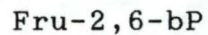
## CHAPITRE IV.

### DOSAGE DU FRUCTOSE-2,6-BIPHOSPHATE.

#### 1. Principe

La méthode que nous utilisons est celle de Van Schaftingen(1984) modifiée par Bruni[Bruni *et al.*,1989]. Cette technique se base sur la propriété qu'a cet ester bisphosphaté de stimuler la phosphofructokinase d'origine végétale dépendant du pyrophosphate(P<sub>Pi</sub>-PFK) par augmentation de son affinité pour son substrat, le fructose-6-phosphate.

En voici le schéma réactionnel:



GDH\*\*\* = glycérol -3Phosphate déshydrogénase  
 TIM\*\* = triose-P isomérase  
 ALD\* = aldolase  
 GAP = D-glycéraldéhyde-3-Phosphate  
 DAP = dihydroxyacétone phosphate

L'activité de la PFK-1 est essentiellement dépendante de la présence du Fru-2,6-bP. La séquence des réactions décrites ci-dessus conduit 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 que la concentration en Fru-2,6-bP diminue. En effet, moins il y a de fructose-2,6-biphosphate et plus le NADH est capable de réagir avec le colorant 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 (Microplates Reader-dynatic MR-600) capable d'analyser des échantillons placés sur une plaque multipuits. Cette méthode offre plusieurs avantages:

- 1) Dans une telle plaque, il y a 96 puits, ce qui permet de faire plusieurs réplicats par test et donc d'avoir un résultat statistiquement plus proche de la réalité.
- 2) La lecture des absorbances est très rapide, en moins d'une minute. Ceci constitue un avantage appréciable quand on sait que le complexe coloré mel-dola blue-NADH n'est stable que pendant 20 minutes.

## 2. Réactifs et solutions.

### 1. Mixture NADH préparée à partir de:

- TRIS/acétate (TRIS M; pH 8,0)  
(Janssen Chimica, 16-762-78)
- Acétate de Mg (0,1 M)  
(UCB, 1424)
- Fructose-6-Phosphate (0,1 M)  
(Sigma, F-3627)
- NADH (10 mg pour 50 ml H<sub>2</sub>O)  
(Sigma, N-8129)

(TRIS 100mM/Mg<sup>++</sup> 4mM/F-6-P 2mM/NADH 0,3mM)

2. Pyrophosphate de sodium (10mM) (Sigma, P-9146)
3. Fructose-2,6-Biphosphate (10mM) (Sigma, F-7006)
4. Meldola Blue (0,3 %) préparé dans HCL 1N et filtré  
(Sigma, D-8142)
5. Solution d'enzymes auxiliaires: elle est préparée dans un tampon TRIS/acétate 25mM pH 8,0 contenant du NaCl 50 mM et de l'albumine sérique 0,2% ainsi

que 5U/ml d'aldolase, 17U/ml de glycérol-3-phosphate déshydrogénase et 50U/ml de triose-P-isomérase. Cette solution enzymatique a été préalablement débarrassée du sulfate ammonique qu'elle contient par filtration sur tamis moléculaire du type Séphadex PD10 (Pharmacia). On inclut extemporanément dans la mixture 0,1U/ml de phosphofructokinase dépendant du pyrophosphate.

### 3. Mode Opératoire.

La mesure des concentrations en Fru-2,6-bP se réalise sur 10 $\mu$ l d'échantillon traités spécifiquement (voir point B du chapitre 2 de Matériel & Méthodes). On y ajoute 250 $\mu$ l d'une mixture réactionnelle préparée à partir de 5,6 ml H<sub>2</sub>O, 1,8 ml de la solution d'enzymes auxiliaires (solution 5), 8 ml de la solution de NADH (solution 1) et 0,8 ml de la solution de pyrophosphate (solution 2). On laisse incuber pendant 20 minutes à 30°C, puis on arrête la réaction avec 25 $\mu$ l de SDS 10%. Ensuite on révèle avec 75 $\mu$ l de Meldola blue 0,3% (solution 4) et la plaque est placée sur un agitateur. Le NADH résiduel est mesuré indirectement à 540nm au spectrophotomètre (Microplates Reader Dynatic MR-600), 15 minutes après addition du colorant. Le signal obtenu est stable pendant 20 minutes.

N.B. les blancs sont réalisés dans les mêmes conditions mais en absence du Fru-2,6-bP.

### 4. Conditions de dosage du Fru-2,6-bP.

#### 4.1 Courbe étalon et dilutions des échantillons.

-----

L'étalonnage est réalisé à partir de concentrations croissantes en Fru-2,6-bP allant de 0,05 picomole à 1 picomole/10 $\mu$ l. Dans ces conditions, il existe une relation linéaire entre l'augmentation d'absorbance et celle du Fru-2,6-bP. La détermination de sa concentration dans les deux types de branchies se fait sur le surnageant neutralisé que l'on dilue entre 2 et 8



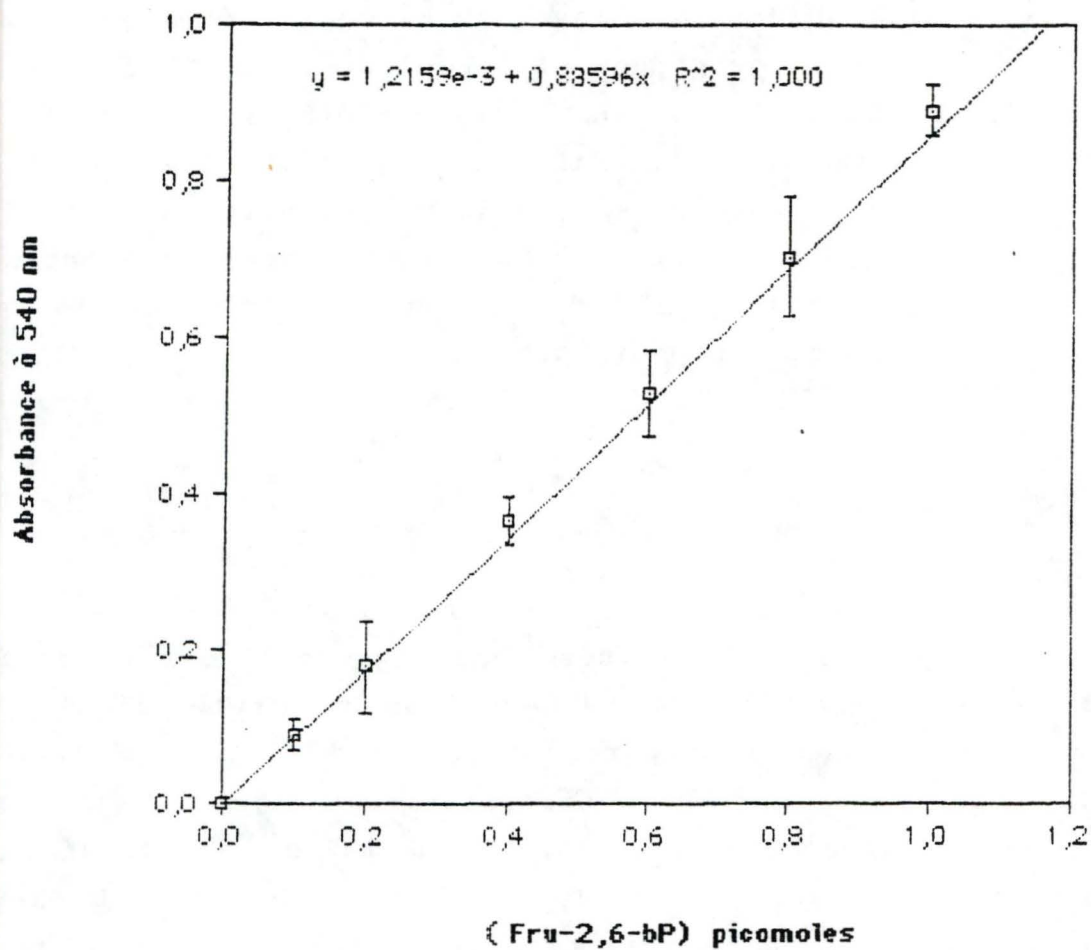


Figure 2: Dosage du Fru-2,6-bP à partir d'une solution étalon 10mM. Chaque valeur est la moyenne de plusieurs dosages effectués sur une même solution  $\pm$  écart-type.

fois avec du NaOH 50 mM. La zone de linéarité est comprise entre 0,025 et 1 pmole de Fru-2,6-bP; en dehors de cet intervalle, l'absorbance n'est plus proportionnelle à la concentration en Fru-2,6-bP (voir figure 2).

Comme la zone de linéarité du dosage dépend de la qualité du colorant, nous avons réalisé pour chaque set expérimental une droite d'étalonnage.

#### 4.2 Effet du traitement du tissu.

-----

Si on veut déterminer la concentration en Fru-2,6-bP présente dans les deux types de branchies, il est primordial de s'assurer que le traitement du tissu nécessaire pour isoler le métabolite en question n'altère pas celui-ci. Dans le même ordre d'idée, il est tout aussi important de traiter l'étalon de la même manière que l'échantillon.

En effet, l'étalon se trouve dans une solution de NaOH 50 mM alors que l'échantillon se trouve dans une solution de NaOH neutralisée. Cette différence de pH peut-elle avoir une grande influence sur le résultat final?

Pour répondre à ces interrogations, nous avons réalisé l'expérience préliminaire suivante.

Après avoir homogénéisé une branchie selon la méthode décrite précédemment, nous avons séparé l'homogénat en deux fractions de même volume. Dans l'une, nous avons ajouté une quantité connue de Fru-2,6-bP, soit 10  $\mu$ l d'une solution 10  $\mu$ M (étalon interne). L'objectif de cette opération est double:

1. calculer le taux de récupération après la procédure préparative.

2. montrer que le fait de traiter l'étalon n'affecte pas la concentration en Fru-2,6-bP. (puisque l'étalon a été ajouté à l'homogénat juste avant de chauffer à +80°C)

La quantité totale de Fru-2,6-bP contenue dans l'extrait tissulaire enrichi en étalon interne soustrait de celle de l'extrait tissulaire seul devrait être égale à l'étalon interne.

Un extrait de BP(soit 10 $\mu$ l)traité avec ou sans solution étalon donne les résultats suivants:

	picomoles de Fru-2,6-bP
étalon	0,645 .
extrait de BP + étalon	1,476
extrait de BP	0,803

Au vu de ces résultats,le traitement du tissu branchial et de l'étalon n'affecte pas la concentration en Fru-2,6-bP qu'ils contiennent.La valeur observée(1,476)ne s'écarte que très faiblement de la valeur calculée qui serait de 1,448.

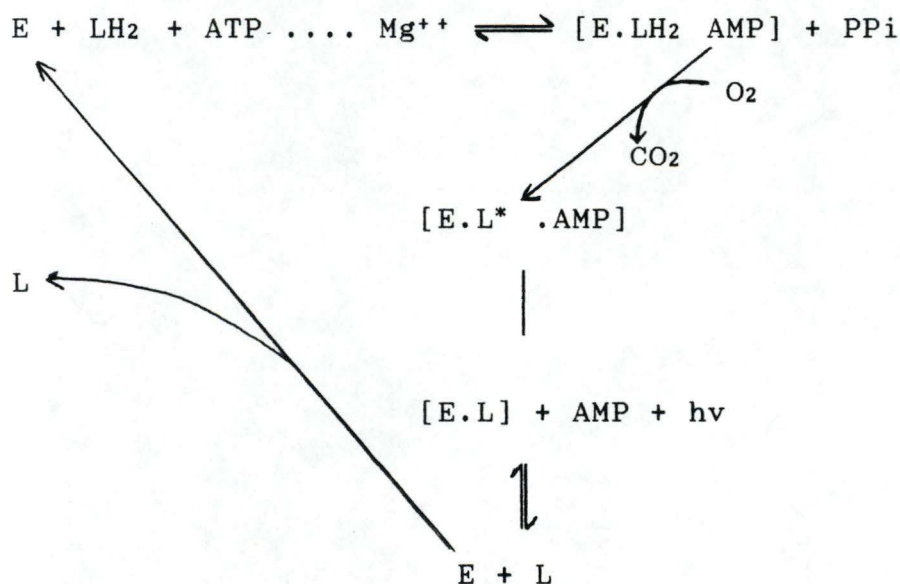
## CHAPITRE V

### DOSAGE DE L'ATP ET DE L'ADP.

#### 1. Principe

Des réactions de bioluminescence sont connues chez divers animaux dont le ver luisant. Les deux constituants indispensables, la luciférine et l'enzyme luciférase, sont extraits des vers luisants et cristallisés.

Dans un premier temps, la luciférine (LH<sub>2</sub>) et l'ATP réagissent pour donner naissance à une luciféryl-adénylate (LH<sub>2</sub>-AMP) qui demeure fortement lié sur le site catalytique de l'enzyme (E). Lorsque cette forme de l'enzyme est exposée à l'oxygène, la luciféryl-adénylate liée à l'enzyme est oxydée en oxyluciférine (L). C'est le passage de cet état excité (E.L\* .AMP) à un état basal plus stable (E.L) qui libère de l'énergie sous forme de photons (Lehninger, 1974).

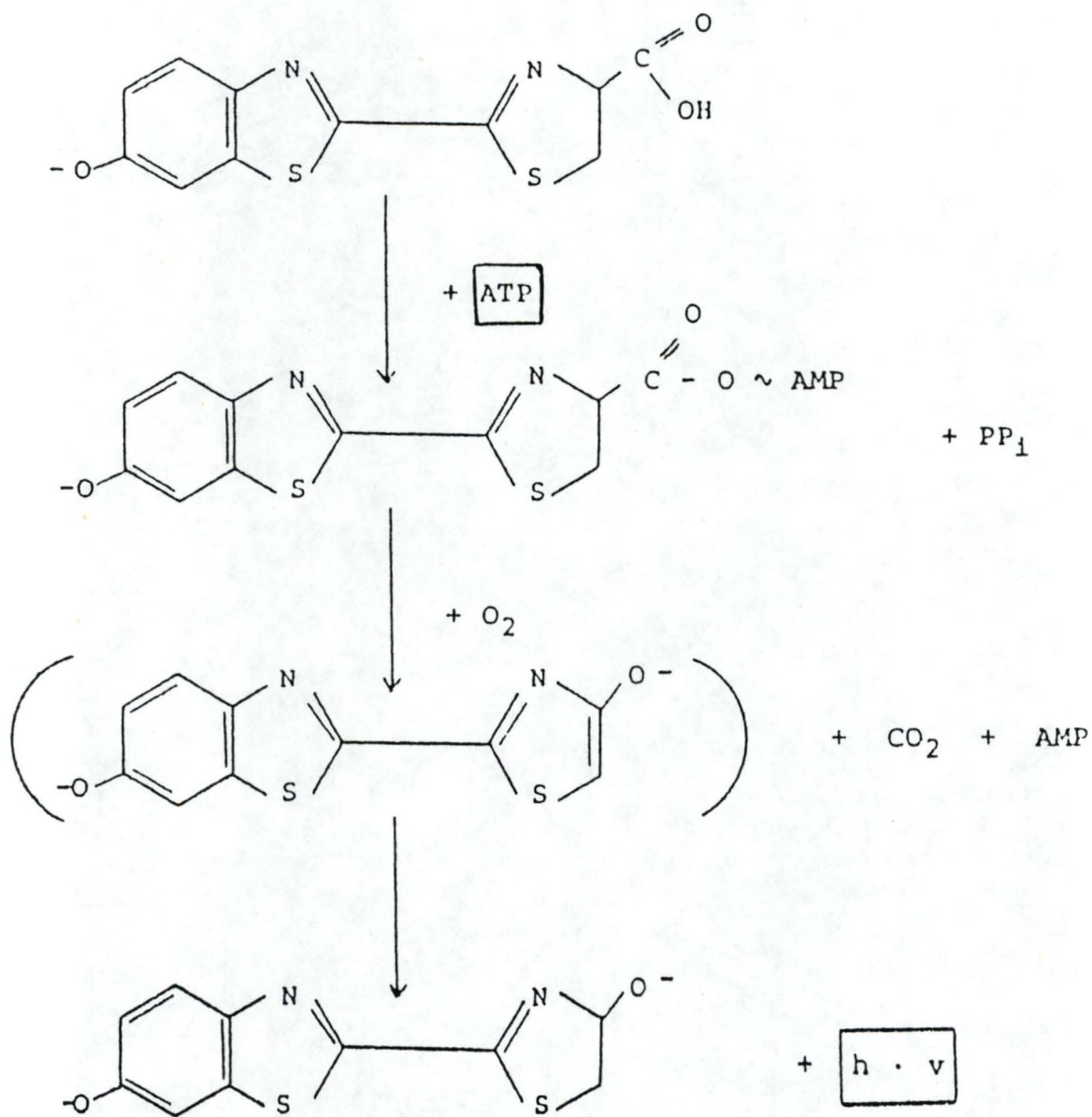


Cette méthode permet de mesurer des quantités d'ATP de l'ordre de la picomôle. De plus, la réaction est hautement spécifique à l'ATP.

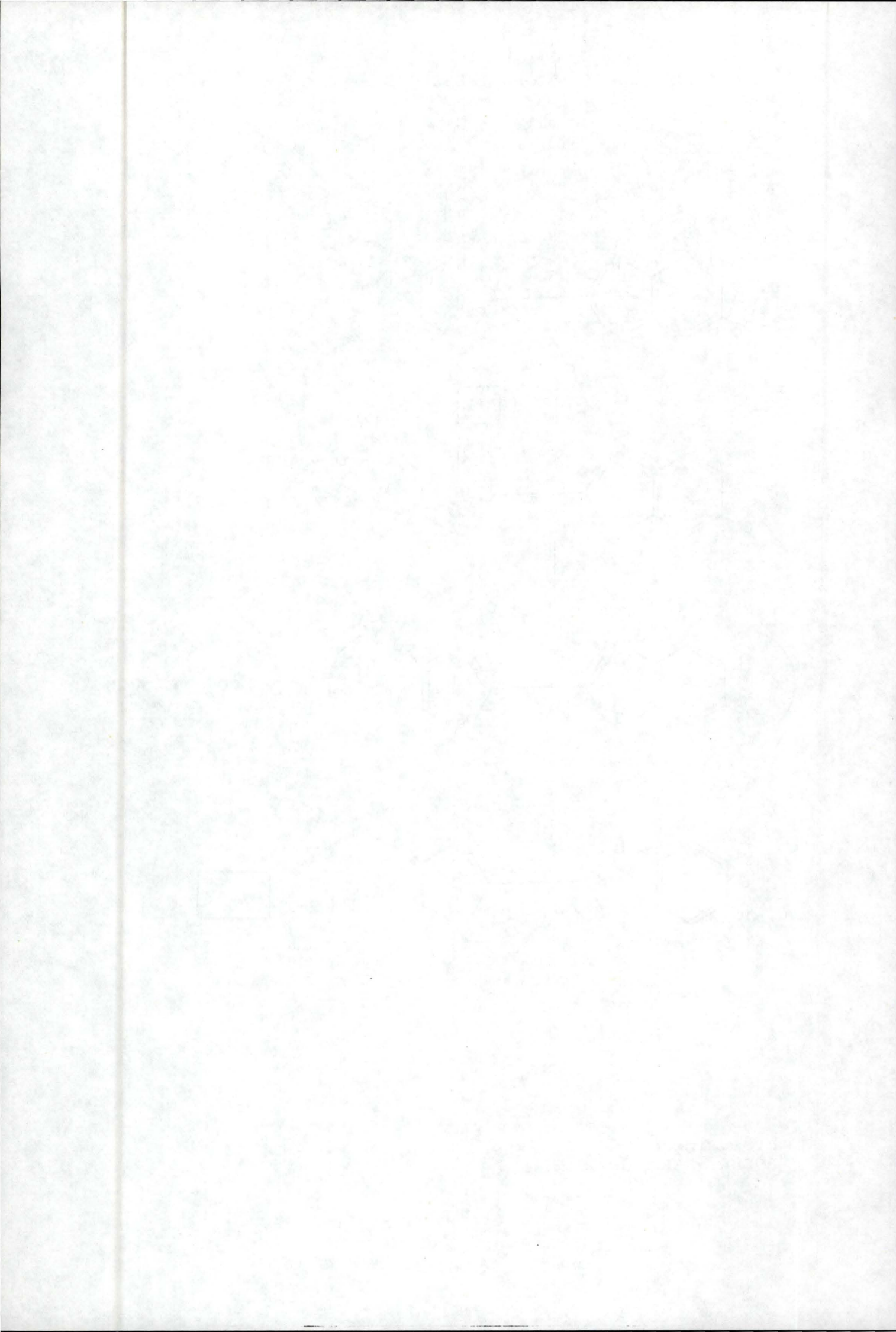
V. HISTORICAL

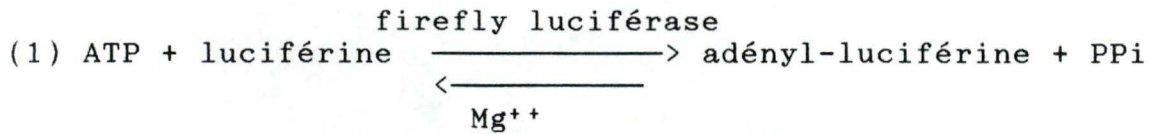
1844 - 1847 - 1848 - 1849 - 1850 - 1851 - 1852

PHOTINUS PYRALIS BIOLUMINESCENCE



Bioluminescence  
BOEHRINGER MANNHEIM



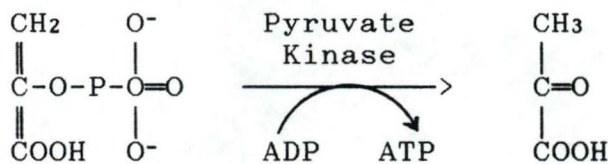


La réaction (1) est réversible et l'équilibre est dirigé vers la droite.

La réaction (2) est essentiellement irréversible. Quand l'ATP est le réactif limitant, l'émission lumineuse est proportionnelle à la quantité d'ATP présente.

Le maximum d'énergie lumineuse est émis à 540nm.

La mesure d'ADP fait intervenir sa conversion en ATP par la pyruvate kinase transférant un groupement phosphate du phosphoénolpyruvate sur l'ADP [R. Hampp, 1985].



## 2. Produits et préparations.

- a) Kit lyophilisé stock FL-AAM (ATP ASSAY MIX):  
poudre lyophilisée contenant la luciférine/luciférase, du MgSO<sub>4</sub>, du DTT, de l'EDTA, de l'albumine sérique bovine et du tampon tricine. (Sigma chemical company). C'est la mixture réactionnelle.
- b) Etalons:  
ATP stock: solution 2.10<sup>-3</sup>M dans l'eau bidistillée portée à pH 7,0 avec du KOH 0,1M. (Sigma, A-3377)  
ADP stock: même préparation que ci-dessus.  
(Sigma, A-2754)
- c) Solution d'incubation (préparée dans le tampon d'extraction):
- |   |          |
|---|----------|
| PEP (phosphoénolpyruvate) (Sigma, P-7252) | 1,4 mM   |
| MgSO <sub>4</sub> (Merck, 5886)           | 10 mM    |
| Pyruvate kinase (PK) (Sigma, 9645)        | 9,4 kU/l |





d) Prétraitement des ustensiles.

Toute la verrerie doit être débarrassée de traces d'ATP et d'ions avant la mesure.

Les tubes tests sont ainsi laissés toute une nuit dans l'acide chlorhydrique molaire pour enfin être consciencieusement lavés et rincés à l'eau distillée. Les embouts des pipettes automatiques entrant en contact avec quelque échantillon ou réactif suivent le même traitement. Le séchage s'effectue à  $\pm 100^{\circ}\text{C}$ .

D'autre part, l'eau bidistillée sera stockée dans un récipient en verre et dans les conditions de stérilité strictes.

### 3. Mode opératoire.

Après extraction, l'ATP est directement dosé sur un aliquot de surnageant grâce à la solution réactionnelle luciférisine/luciférase et au moyen d'un spectrophotomètre à luminescence (Perkin-Elmer LS-5B).

Le dosage de l'ADP nécessite, lui, sa préconversion en ATP: il devra donc être préincubé dans un milieu contenant un excès de pyruvate kinase et du phosphoénolpyruvate. Nous avons observé une conversion complète d'ADP en ATP après 30 minutes à température ambiante.

Le dosage s'effectue comme suit:

1) pour le dosage de l'ATP.

-----

<u>composants</u>	<u>quantités</u>
Surnageant	100 $\mu\text{l}$ [ou x $\mu\text{l}$ de surnageant + (0,1 - x) $\mu\text{l}$ de tampon]
H <sub>2</sub> O bid.	880 $\mu\text{l}$
mixt. réaction.	20 $\mu\text{l}$

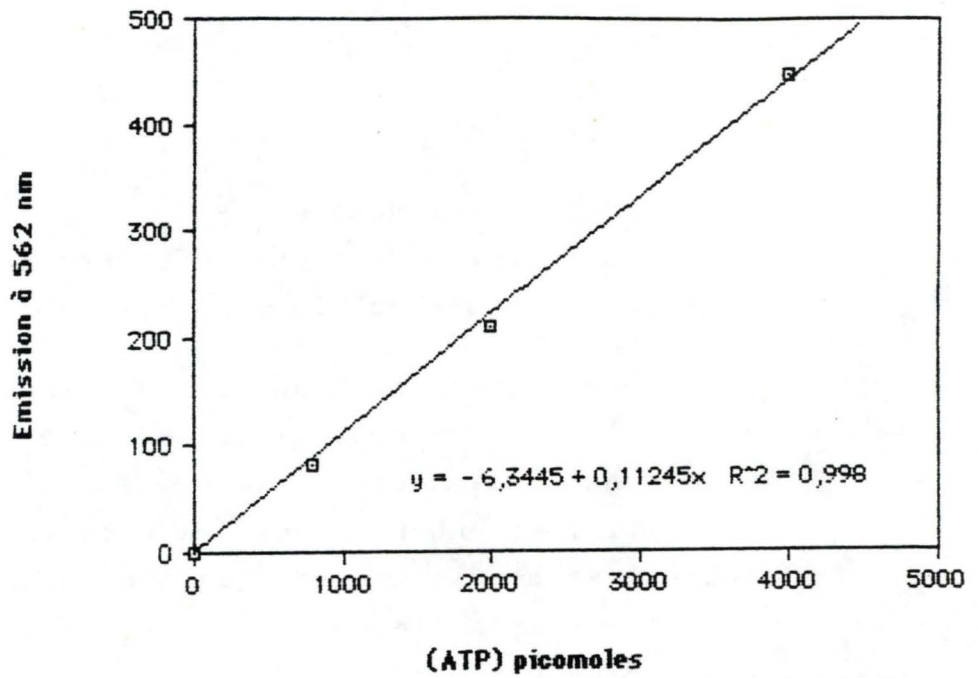


Figure 3: Droite d'étalonnage de l'ATP dans le milieu d'extraction.

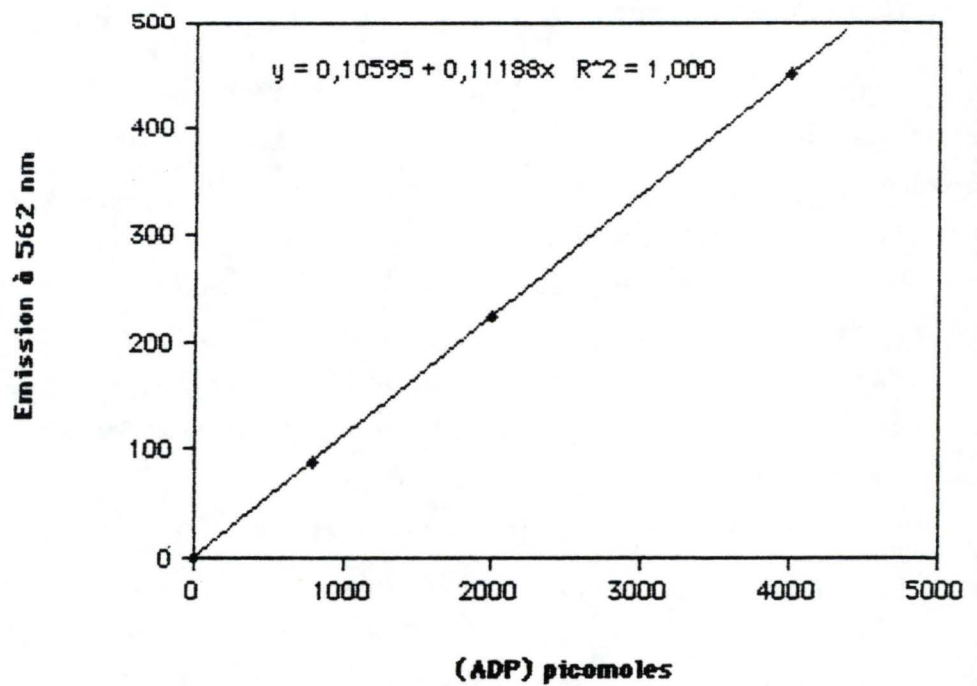


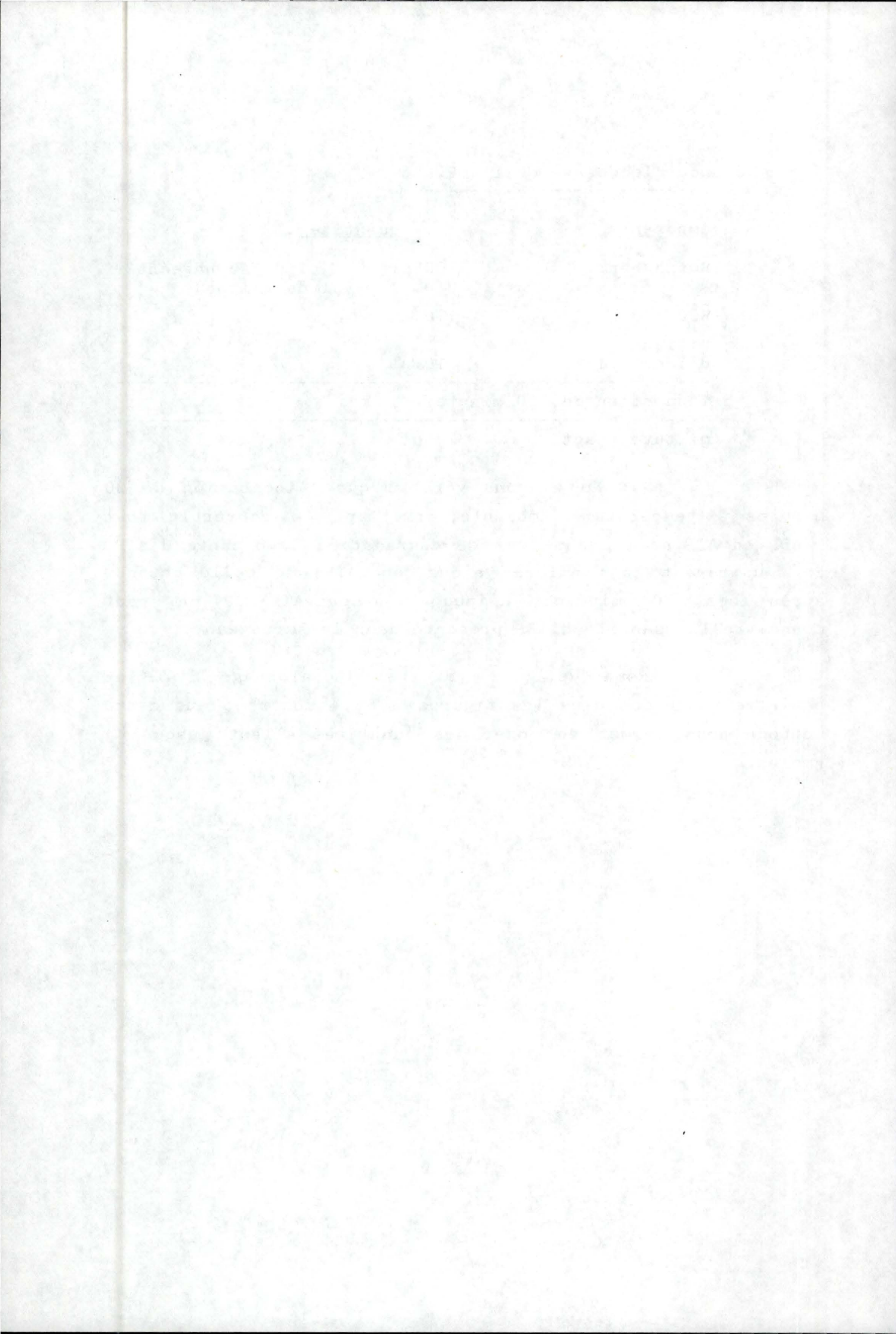
Figure 4: Droite d'étalonnage de l'ADP dans le milieu d'extraction.

## 2) pour le dosage de l'ADP.

<u>composants</u>	<u>quantités</u>
Surnageant	100 $\mu$ l [ou x $\mu$ l de surnageant + (0,1 - x) $\mu$ l de tampon]
H <sub>2</sub> O bid.	770 $\mu$ l
Milieu d'incubation	110 $\mu$ l
-----	
Incubation de 30 minutes(*)	
-----	
mixture réact.	20 $\mu$ l

(\*): Nous avons vérifié que l'incubation de 30 minutes à température ambiante, permettant de convertir tout l'ADP en ATP, ne provoque pas de dégradation importante d'ATP. En soustrayant la première valeur (conc. ATP) de celle obtenue après ces 30 minutes d'incubation (conc. ATP+ADP), on peut connaître la quantité d'ADP présente dans le surnageant.

Remarque: les droites d'étalonnage d'ATP et d'ADP, représentées dans les figures 3 et 4 montrent que cette méthode nous permet de doser des quantités allant jusqu'à 4 nmoles.



# RESULTATS

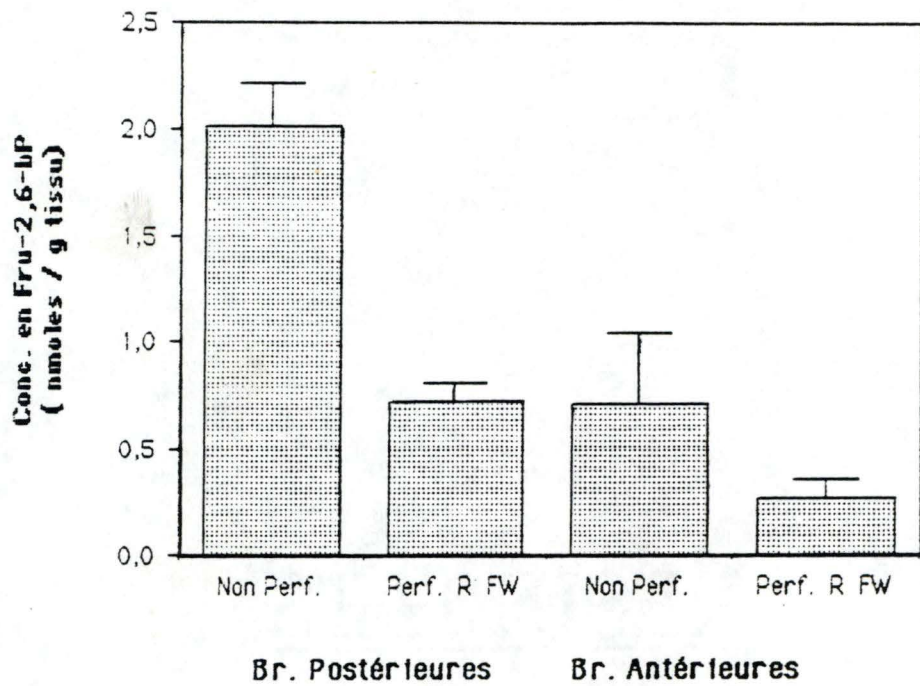


Figure 1: Concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) non perfusées et perfusées avec un Ringer "FW" (n=6). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 6 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

# CHAPITRE I

## EFFET DE LA PERFUSION SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-bP ET SUR LE RAPPORT ATP/ADP DANS LES DEUX TYPES DE BRANCHIES DU CRABE CHINOIS ACCLIMATE A L'EAU DOUCE.

Nous avons perfusé plusieurs branchies antérieures et postérieures du crabe avec une solution physiologique, de même caractéristique osmotique que l'hémolymphe, pendant une heure dans les conditions décrites au chapitre III de Matériel et Méthodes. Elles ont ensuite été congelées puis soumises aux traitements respectifs comme décrit précédemment pour la mesure du Fru-2,6-bP et du rapport ATP/ADP.

### 1. Fructose-2,6-bisphosphate.

Les résultats de la mesure du taux de Fru-2,6-bP dans les branchies postérieures et antérieures perfusées sont repris dans le tableau 1 et comparés aux taux de Fru-2,6-bP dans les branchies non perfusées. La figure 1 permet de comparer graphiquement les moyennes des concentrations en Fru-2,6-bP.

Tableau 1

BP non perf. (nmoles/gr)	BP perf. (RFW) (nmoles/gr)	BA non perf. (nmoles/gr)	BA perf. (RFW) (nmoles/gr)
2,014	0,871	1,177	0,345
1,845	0,698	0,887	0,273
1,963	0,697	0,585	0,150
2,032	0,630	0,963	0,376
2,474	0,630	0,273	0,242
1,770	0,775	0,365	0,199
$\bar{X}=2,016$ $\sigma=0,204$ $\sigma^2=0,05$	$\bar{X}=0,717$ $\sigma=0,0885$ $\sigma^2=0,007$	$\bar{X}=0,708$ $\sigma=0,326$ $\sigma^2=0,106$	$\bar{X}=0,264$ $\sigma=0,078$ $\sigma^2=0,006$

Nous utilisons ici un test ANOVA1 pour comparer les concentrations en Fru-2,6-bP avec ou sans perfusion dans les deux types branchiaux, et déterminer si les moyennes obtenues sont statistiquement différentes l'une de l'autre. (Ce test statistique sera également appliqué pour chacune des expériences



# MEMORANDUM

TO : [Illegible]

FROM : [Illegible]

SUBJECT : [Illegible]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

[Illegible text]

réalisées au cours de ce travail. On a fixé le seuil de signification à 95%)

A l'issue de cette expérience, nous pouvons constater trois faits intéressants:

(1) La concentration en Fru-2,6-bP est significativement différente entre les BP et les BA non perfusées.

(2) La perfusion entraîne une diminution significative de la concentration en cet ester métabolique dans les deux types branchiaux.

(3) Cette baisse est significativement plus importante dans les BP par rapport aux BA.

# Nous confirmons les résultats de Mellouki(1990). En effet, le taux de Fru-2,6-bP dans les BP (moyenne = 2,016 nmol/gr tissu) est supérieur à celui de BA (moyenne = 0,708 nmol/gr tissu). Cette valeur plus importante dans les branchies postérieures est vraisemblablement liée au rôle osmorégulateur particulièrement important de ce tissu branchial [Péqueux et Gilles, 1981]. En effet, des études cytochimiques ont montré que la membrane plasmique de cette branchie postérieure forme une grande quantité d'invaginations et de replis (= grande surface d'échange) qui sont le lieu d'action de pompes ioniques et de la (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase en particulier.

Nous avons vu dans l'introduction (Chap. III) que le Fru-2,6-bP est un indicateur glycolytique puissant chez les mammifères. Il intervient dans la régulation de la glycolyse et donc de la néoglucogenèse en agissant à travers la PFK-1 sur le cycle F-6P/F-1,6-bP [Hue et Rider, 1985]. Nous pensons donc que, chez les crustacés, le Fru-2,6-bP peut intervenir aussi comme modulateur du flux glycolytique à travers une plus grande activité de la PFK-1.

# Nous observons que la perfusion diminue aussi bien dans les branchies postérieures que dans les branchies antérieures la concentration en Fru-2,6-bP; on constate en effet une diminution d'un facteur 2 du taux de Fru-2,6-bP dans les BA (pour un facteur 3 dans les BP).



Nous pensons que:

a) la perfusion nécessite l'isolement du tissu branchial du reste des organes, ce qui peut provoquer un apport réduit de glucose nécessaire à la formation du F-6-P, substrat indispensable à la synthèse du Fru-2,6-bP et donc un ralentissement de la glycolyse.

b) lorsqu'on perfuse, on maintient la branchie dans un état d'activité physiologique, même si elle est privée de ses afférences organiques. Une branchie postérieure qui perfuse avec une solution "FW" est une branchie qui transporte, donc qui demande de l'énergie; elle doit utiliser une partie non négligeable de son Fru-2,6-bP pour maintenir la glycolyse à un niveau compatible avec l'activité de transport.

On peut suivre le même raisonnement pour la branchie antérieure: celle-ci, placée dans les mêmes conditions qu'une branchie postérieure, transporte moins [Péqueux et Gilles, 1978a et 1988]. Elle utilise aussi une partie de son Fru-2,6-bP pour maintenir un taux métabolique compatible avec l'activité physiologique; c'est pourquoi on constate également une diminution du taux de Fru-2,6-bP dans ce type de tissu.

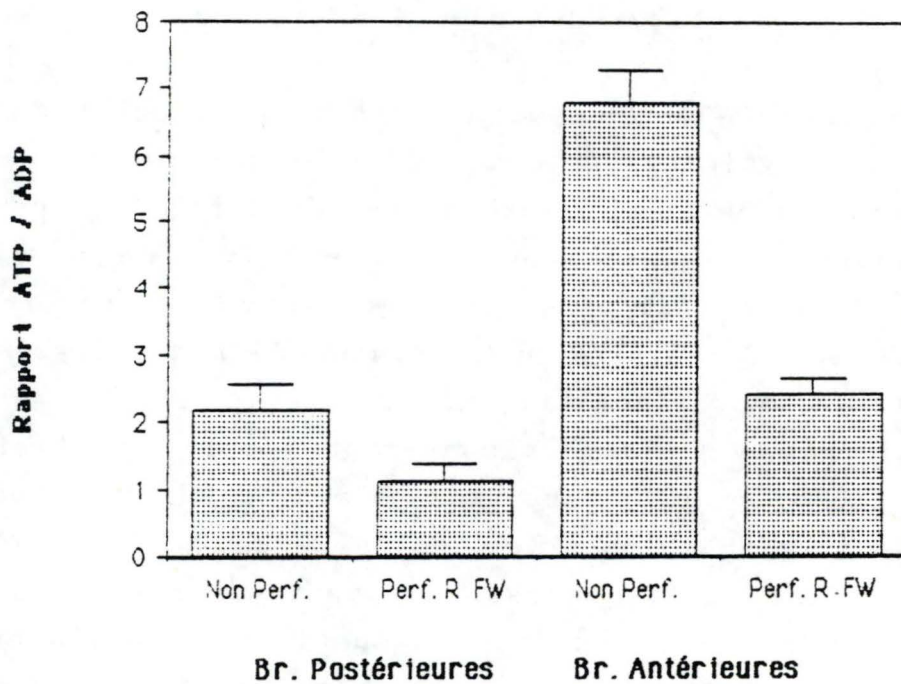


Figure 2 Rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) non perfusées (n=4) ou perfusées avec un Ringer "FW" (n=4). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 4 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

## 2. le rapport ATP/ADP.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous et dans la figure 2 ci-contre.

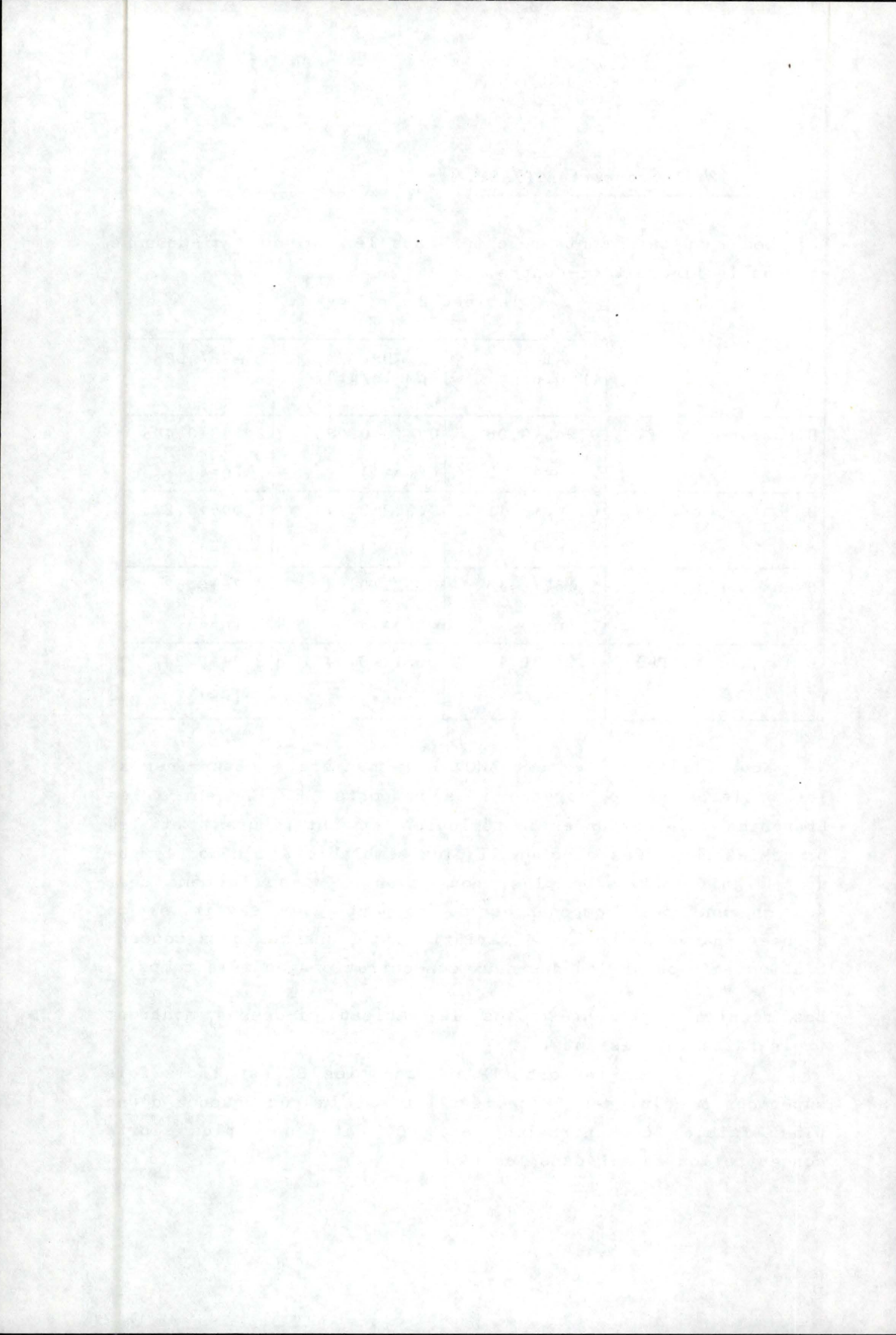
Tableau 2

	ATP ( $\mu$ mole/gr)	ADP ( $\mu$ mole/gr)	ATP/ADP
B.Post.non perf.	0,943+0,06 (n=4)	0,446+0,085 (n=4)	2,163+0,408 (n=4)
B.Post. perf.(FW)	0,603+0,114 (n=4)	0,589+0,171 (n=4)	1,095+0,275 (n=4)
B.Ant.non perf.	2,157+0,15 (n=4)	0,321+0,041 (n=4)	6,78+0,53 (n=4)
B.Ant. perf.(FW)	1,246+0,19 (n=4)	0,514+0,042 (n=4)	2,41+0,24 (n=4)

Nous utilisons le test ANOVA1 de manière à déterminer si les différences de moyennes des rapports ATP/ADP entre les branchies non perfusées (postérieures et antérieures) et les branchies perfusées avec un liquide semblable à l'hémo lymphé sont significatives. De plus, nous avons réalisé le même test sur chacune des composantes du rapport pour savoir si ce dernier change suite à une variation de l'une des deux concentrations (ATP ou ADP) ou des deux concentrations en même temps.

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent trois faits intéressants:

(1) le rapport ATP/ADP dans les BA est trois fois supérieur à celui des BP: ce résultat est la conséquence d'une plus faible concentration en ADP et une plus forte concentration en ATP dans les BA.

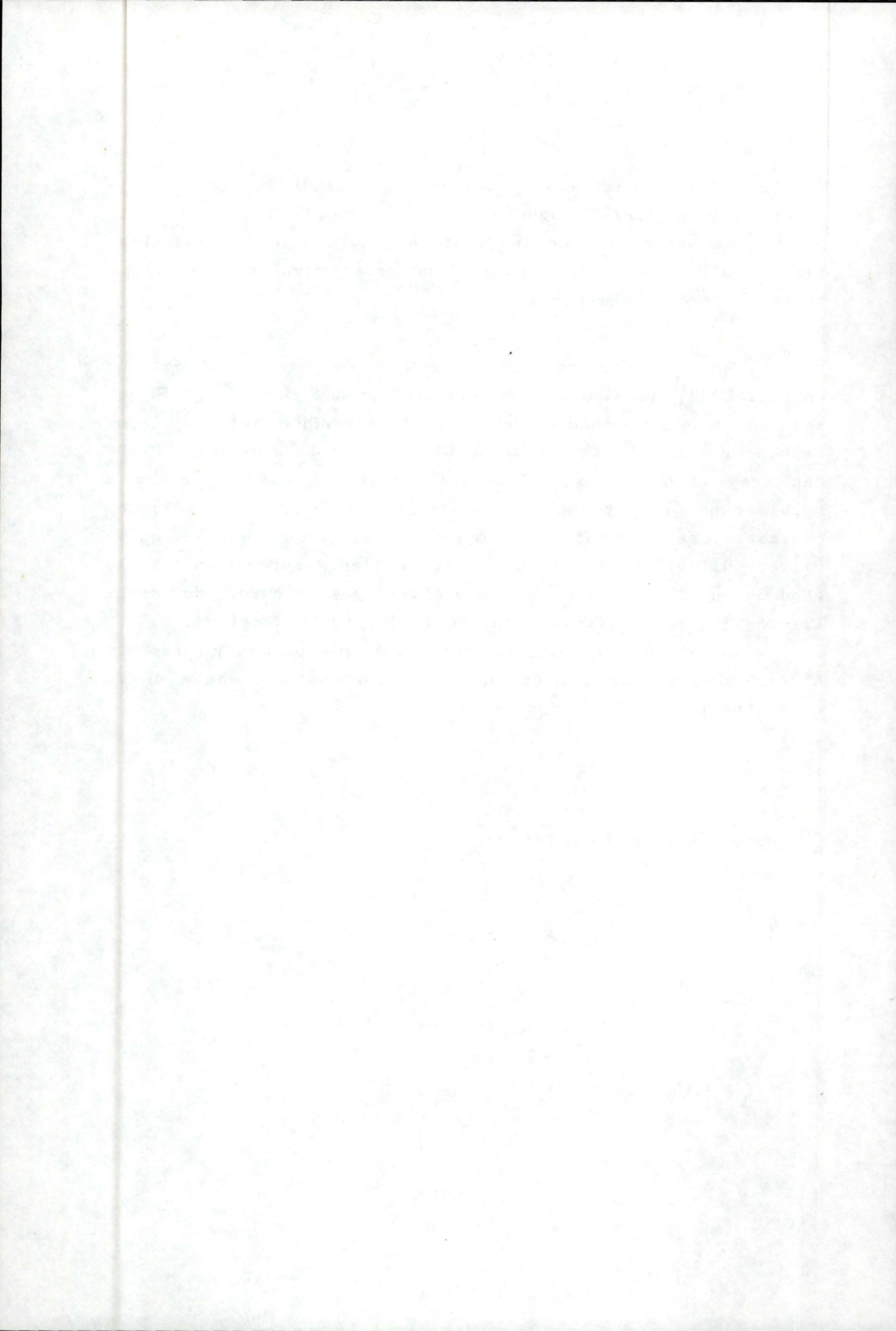


(2) la perfusion entraîne une diminution significative du rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies. Cette baisse est provoquée par une forte diminution de la concentration en ATP alors que le taux d'ADP reste quasi constant (il a tendance même à augmenter).

# Nous confirmons les résultats de Wanson (1983) et de Hayette (1990) qui montraient une différence entre les BP et les BA dans la mesure du rapport ATP/ADP chez le crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce. Le rapport ATP/ADP dans les branchies antérieures (moyenne = 6,7) est supérieur à celui dans les branchies postérieures (moyenne = 2,163). Ces constatations peuvent se comprendre si l'on suppose qu'en milieu dilué, l'utilisation d'énergie est supérieure à la production d'ATP dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* (voir chapitre II de l'introduction).

# La perfusion entraîne également une baisse du rapport ATP/ADP de la même manière qu'elle provoque une chute de la concentration en Fru-2,6-bP.





## CHAPITRE II

EFFET DES BIOAMINES SUR LA DDP TRANSEPITHELIALE, SUR LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-BP ET SUR LE RAPPORT ATP/ADP.

### 1. Introduction

Chez les mammifères, on sait que le contrôle de la glycolyse peut s'effectuer via l'intervention d'hormones telles l'insuline et le glucagon. Chez les crustacés, nombreux sont les auteurs qui pensent que ce contrôle se ferait par l'intermédiaire des bioamines comme la sérotonine et la dopamine. Le message qu'apportent ces neurohormones est traduit intracellulairement en nucléotides cycliques (AMPC ou GMPC). Chez les mammifères, ces messagers secondaires peuvent activer des protéines kinases (A, C ou G) qui vont, à leur tour, phosphoryler de nombreuses protéines parmi lesquelles la PFK-2 et la FBPase-2 responsables de la synthèse du Fru-2,6-bP ou de sa dégradation. La phosphorylation de ce système PFK-2/FBPase-2 provoque une augmentation de l'activité de la PFK-2 et une diminution de l'activité de la FBPase-2, ce qui favorise la synthèse du Fru-2,6-bP. Cette cascade de réactions a été notamment démontrée dans le foie de rat par Hue et Rider (1987). Comme l'activité de ces protéines kinases et des phosphatases dépendent de messages hormonaux, ceci nous amène à perfuser les branchies d'*Eriocheir sinensis* avec ces bioamines de manière à déterminer si leur intervention est possible dans la régulation du flux glycolytique, et donc dans la modulation de la concentration en Fru-2,6-bP chez ce crabe acclimaté à l'eau douce.

Par ailleurs, nous avons vu que l'équilibre hydrominéral est contrôlé par des facteurs endocrines tels que la dopamine; la concentration hémolympatique de cette bioamine augmente lors du transfert des crabes *Carcinus maenas* et *Callinectes sapidus* d'un milieu eau de mer à un milieu dilué. Il est donc probable que ces bioamines puissent participer également, chez le crabe *Eriocheir sinensis*, à l'adaptation du métabolisme de l'épithélium branchial aux besoins énergétiques créés par l'acclimatation de ce crabe hyperosmorégulateur à un milieu dilué.

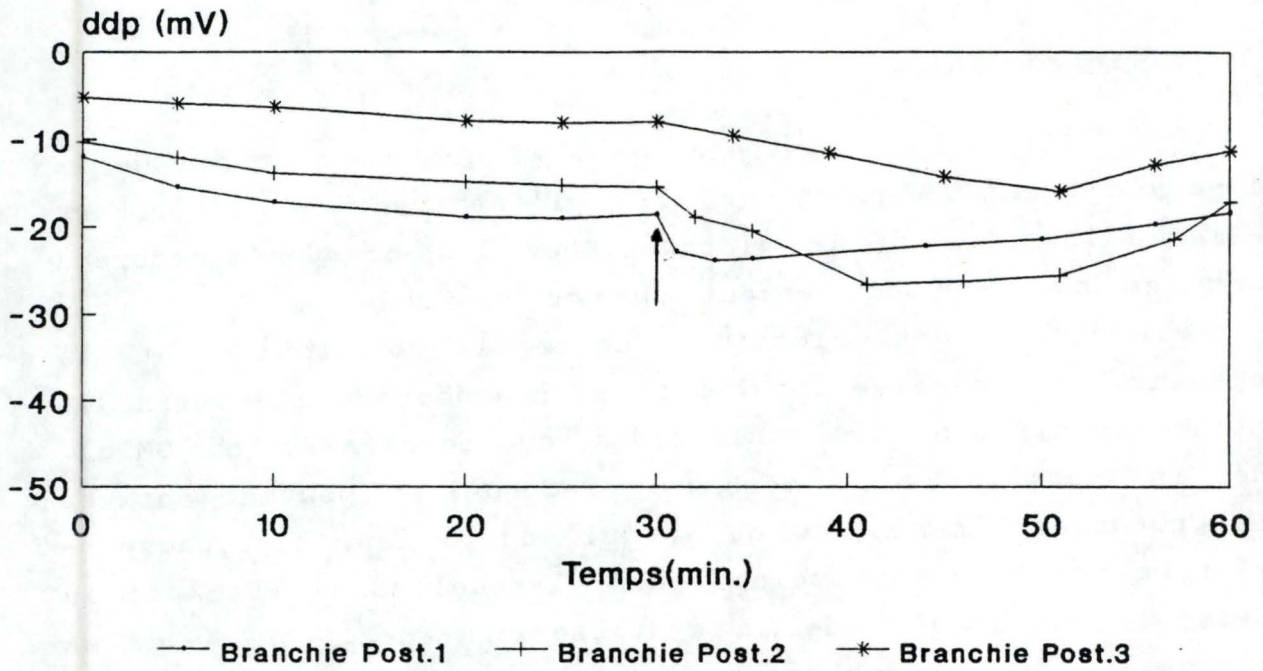


Figure 3. Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale de 3 branchies postérieures (isolées et perfusées) de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce, lors de l'addition de sérotonine  $10^{-4}M$  dans le milieu de perfusion ("In").

## 2.Effet de la sérotonine.

### 2.1 Action de cette bioamine sur la différence de potentiel(ddp)

#### 2.1.1 au niveau des branchies postérieures.

Nous avons préperfusé des branchies postérieures avec un Ringer "FW" pendant 30 minutes, temps nécessaire pour stabiliser la ddp, dans les conditions décrites précédemment. Ensuite, nous additionnons au milieu de perfusion (milieu "In") la sérotonine à une concentration  $10^{-4}M$ , et nous la laissons agir pendant 30 minutes. La ddp qui apparaît entre la face apicale et la face sérosale, c'est-à-dire entre le milieu "Out" et le milieu "In", se mesure régulièrement toutes les deux minutes pendant une heure au moyen d'un électromètre comme décrit au paragraphe 4 du chapitre III de Matériel et Méthodes.

Lorsque la sérotonine est ajoutée au milieu de perfusion ("In"), la ddp négative au début devient encore plus négative pour 3 branchies isolées de 3 crabes différents, comme l'indique très clairement la figure 3. Cette hyperpolarisation dure de 10 à 20 minutes selon la branchie, puis la ddp tend à revenir à sa valeur initiale.

Dans nos conditions expérimentales, où une solution "FW" saline baigne les deux faces de la branchie, la ddp est négative à l'intérieur. Cette caractéristique peut s'intégrer au modèle (établi par Péqueux et Gilles en 1985) selon lequel le mouvement de  $Cl^-$  vers l'intérieur est essentiellement amené par le potentiel de diffusion du  $K^+$ , alors que le mouvement de  $Na^+$  est lié principalement à l'activité de la  $(Na^+-K^+)$  ATPase de la pompe. Les BP sont en effet le siège de deux types de mouvements de  $Cl^-$ : un efflux qui est vraisemblablement passif et un influx qui est généré contre un gradient de concentration important. Ceci est en désaccord avec les résultats antérieurs observés pour le  $Na^+$  [Péqueux et Gilles, 1981 1983 et 1985]. Les BP d'*Eriocheir sinensis* sont de fait imperméables au



$\text{Na}^+$  et montrent seulement une composante active du transport de cet ion. L'influx de  $\text{Cl}^-$  observé est donc probablement associé à un gradient électrochimique généré par un mouvement transépithélial de  $\text{Na}^+$ .

Les BP semblent être ainsi le siège de deux processus indépendants du transport actif, un pour le  $\text{Na}^+$  et un pour le  $\text{Cl}^-$ . En outre l'efflux passif de  $\text{Cl}^-$  montre une cinétique de saturation. Ceci est l'indication d'un mécanisme de diffusion facilitée. Il est aussi intéressant de constater que cet efflux diminue quand la concentration externe en  $\text{Cl}^-$  baisse, en dépit d'une élévation du gradient transépithélial de cet ion. Ceci suggère que la perméabilité des BP au  $\text{Cl}^-$  diminue aux faibles concentrations extérieures du  $\text{Cl}^-$ . Cette imperméabilisation de la membrane des cellules épithéliales est d'une valeur écophysiologique importante, car elle limite la perte de sels en milieu dilués [Gocha *et al.*, 1987 - Bianchini et Gilles, 1988].

L'électronégativité peut dès lors s'expliquer par deux phases d'un mécanisme impliqué dans le transport transépithélial de  $\text{Cl}^-$  [Gocha *et al.*, 1987]:

(1) un système localisé à la face "Out" (face à la membrane plasmique des cellules épithéliales) serait responsable du transport de cet ion du milieu externe vers le compartiment cellulaire, nécessitant la mise en place d'une pompe échangeant les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  à contre sens; cet échangeur fonctionnerait de manière synchrone avec une pompe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (voir point 2.2 du chap. I de l'introduction).

(2) un second système, localisé à la face baso-latérale de la membrane plasmique ("In"), entraînerait pour sa part les ions  $\text{Cl}^-$  de la cellule à l'hémolymphe. Ce mécanisme fonctionnerait via l'existence d'un potentiel local de diffusion généré par le mouvement sortant de  $\text{K}^+$

On doit expliquer l'effet hyperpolarisant de la sérotonine en considérant toutes ces composantes ioniques (flux de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{K}^+$  et surtout de  $\text{Cl}^-$ ) qui participent à l'établissement de la ddp dans les branchies postérieures du crabe chinois acclimaté à l'eau douce. Les résultats obtenus peuvent ainsi s'expliquer si l'on suppose une activation à court-terme de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et des canaux à chlorures localisés sur la face sérosale de

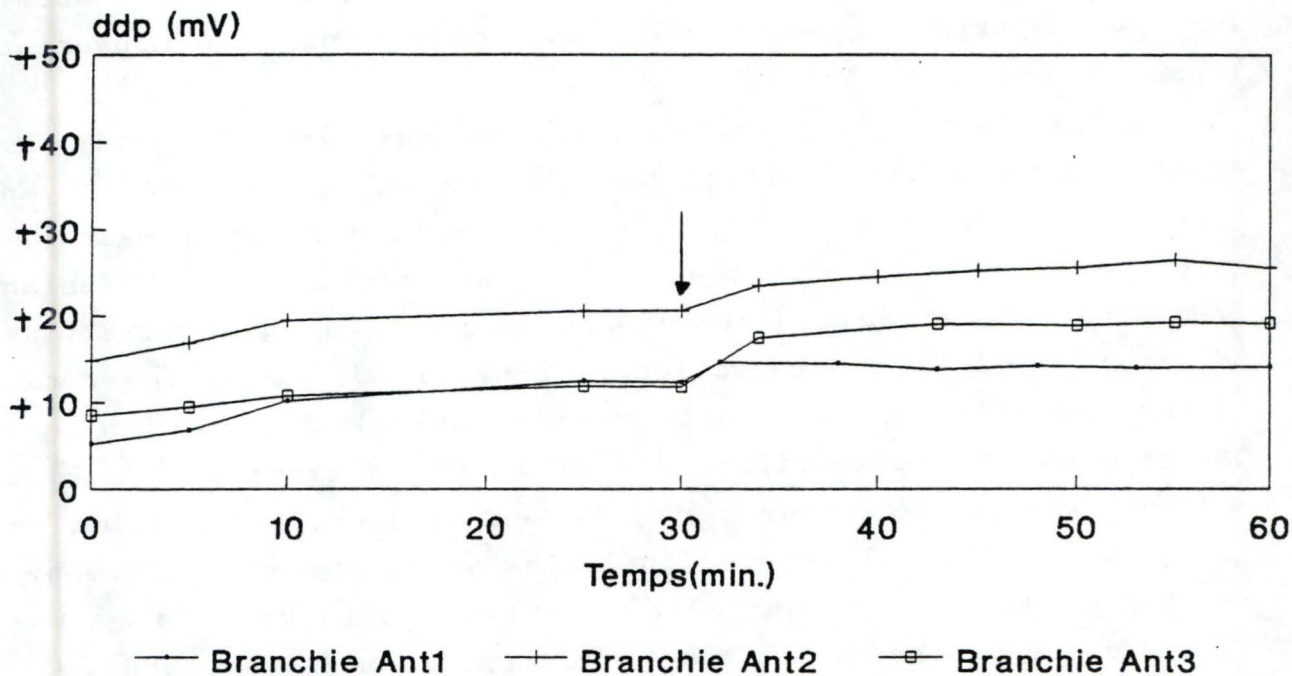


Figure 4. Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale de 3 branchies antérieures (isolées et perfusées) de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce, lors de l'addition de sérotonine  $10^{-4}M$  dans le milieu de perfusion ("In").

l'épithélium branchial. En effet, l'échange externe de  $\text{Cl}^-$  à ce niveau court-circuite le potentiel de diffusion du  $\text{K}^+$ , ce qui fait que l'activation de la pompe ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPasique n'induit pas une dépolarisation mais au contraire provoque une hyperpolarisation à cette face.

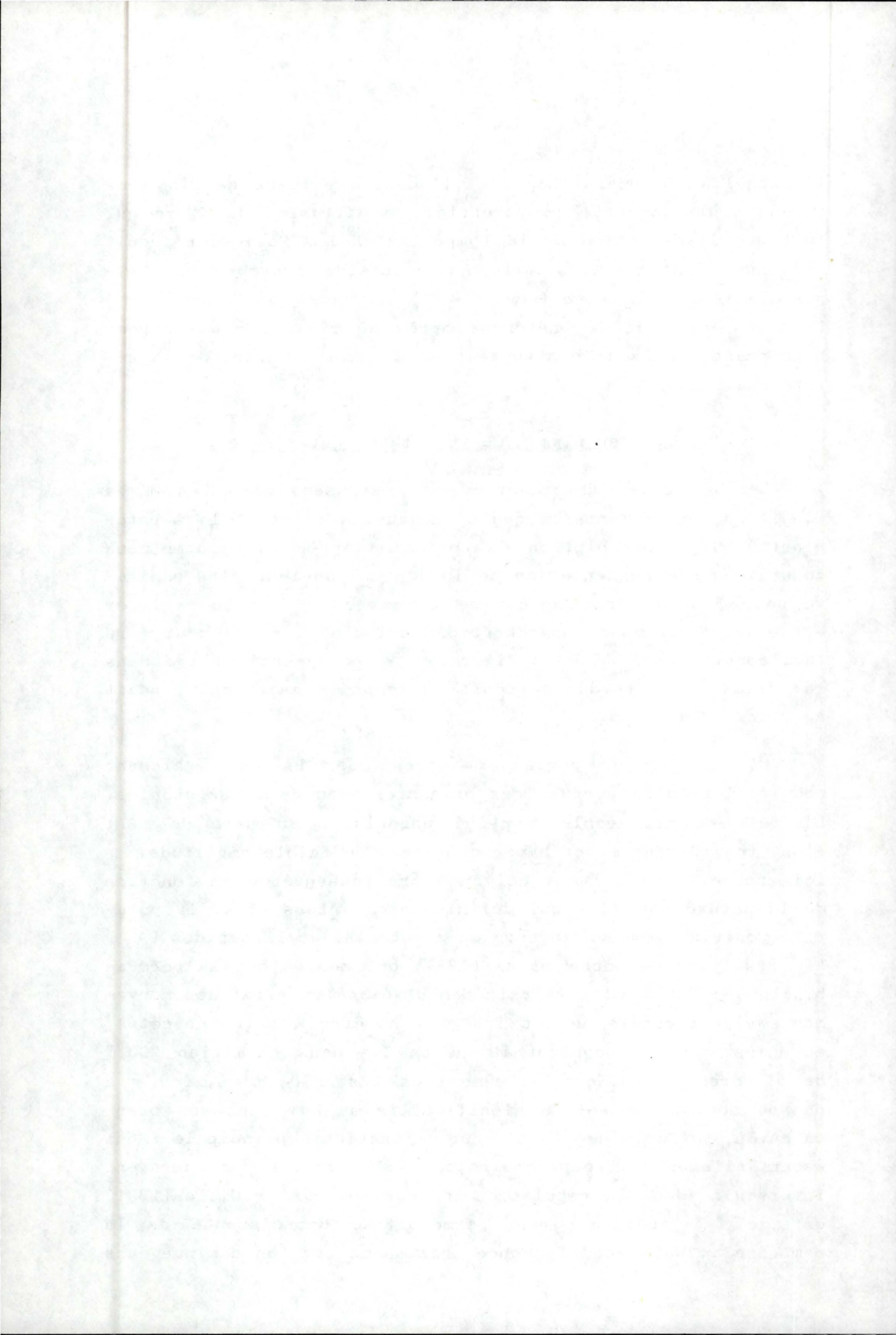
La disparition de ce phénomène après 30 minutes est vraisemblablement liée à la destruction ou à l'inactivation de la sérotonine.

### 2.1.2 au niveau des branchies antérieures.

Les branchies antérieures sont perfusées dans les mêmes conditions expérimentales que ci-dessus. En ajoutant la sérotonine ( $10^{-4}\text{M}$ ) à la solution de perfusion après 30 minutes, nous constatons une augmentation de la ddp qui devient plus positive pour 3 branchies isolées de 3 crabes différents. Ce léger effet hyperpolarisant (augmentation maximale de 6 mV) peut être facilement visualisé à la figure 4. Ce changement observé dans la variation de la ddp au cours du temps se maintient pendant au moins 30 minutes.

L'activité des pompes au niveau des BA est également modulée lorsqu'on perfuse ces branchies avec de la sérotonine. L'effet est comparable à celui enregistré au sein des BP: c'est toujours un effet hyperpolarisant de faible amplitude. Ici encore, les résultats doivent être interprétés en fonction de la nature des flux qui définissent l'intensité et la polarité (positive même en absence de sérotonine) de la ddp des BA. Les résultats de Gocha *et al* (1987) ont montré que la perméabilité des BA au  $\text{Cl}^-$  est extrêmement basse: en effet, des mouvements significatifs de cet ion peuvent être à peine détectés, au moins pour des concentrations en  $\text{Cl}^-$  dans le milieu "Out" de l'ordre de 100mEq/l ou même plus basses. De plus, il n'y a pas de mouvements actifs significatifs du  $\text{Na}^+$  dans ces branchies. En effet, même si leur fonction principale est essentiellement respiratoire, ces branchies pourraient intervenir dans la régulation ionique. Péqueux et Gilles (1981) ont de fait remarqué une perméabilité décroissante de la membrane au  $\text{Na}^+$  quand la concentration en cet ion diminue dans





la solution d'incubation. Cette baisse du niveau de NaCl dans la solution "Out" génère un gradient de diffusion transépithélial In/Out pour cet ion qui s'explique par la variation de la ddp: on passe ainsi d'une valeur positive à une valeur négative de la ddp quand la concentration en NaCl(Out) passe de 240mM à 10mM[Bianchini et Gilles,1988]. Ce changement conduit à une imperméabilisation des branchies aux faibles concentrations externes en Na<sup>+</sup>, ce qui limiterait la perte de sels quand l'animal est placé en eau douce. Ce phénomène est comparable à celui signalé dans les branchies postérieures, mais pour l'ion Cl<sup>-</sup>. Les voies paracellulaires et transcellulaires sont envisagées pour expliquer cette diffusion du Na<sup>+</sup>.

D'autre part, il est clair que la ddp des BA ne peut être expliquée en tenant compte exclusivement des mouvements transépithéliaux passifs de Na<sup>+</sup>. En l'absence de gradient de diffusion du Na<sup>+</sup>, la ddp est de fait significativement positive à l'intérieur et s'explique dès lors par l'existence d'une pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> localisée à la face sérosale, et par la présence d'un système suivant lequel la ddp est principalement liée au gradient de diffusion du K<sup>+</sup> générant l'activité ATPasique de cette pompe[Péqueux et Gilles,1988]. C'est à ce niveau qu'il faut voir le rôle probable de la sérotonine.

Cette bioamine va provoquer une activation du flux des ions positifs de la face apicale(ou externe) vers la face sérosale(ou interne). L'augmentation du flux d'ions Na<sup>+</sup> va accroître le nombre d'ions positifs présents dans le milieu "In". Comme celui-ci est positif, ce transport d'ions va accentuer la ddp qui apparaît entre les deux faces, ce qui se traduit par une hyperpolarisation. Mais cet effet est de moindre intensité que l'on pouvait penser car à la face sérosale de l'épithélium, un potentiel de diffusion pour le K<sup>+</sup> est partiellement court-circuité par la diffusion du Na<sup>+</sup>. La sérotonine pourrait donc agir sur ce gradient de K<sup>+</sup> associé à la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en provoquant vraisemblablement une augmentation du flux de K<sup>+</sup> de l'épithélium vers l'hémolymphe.

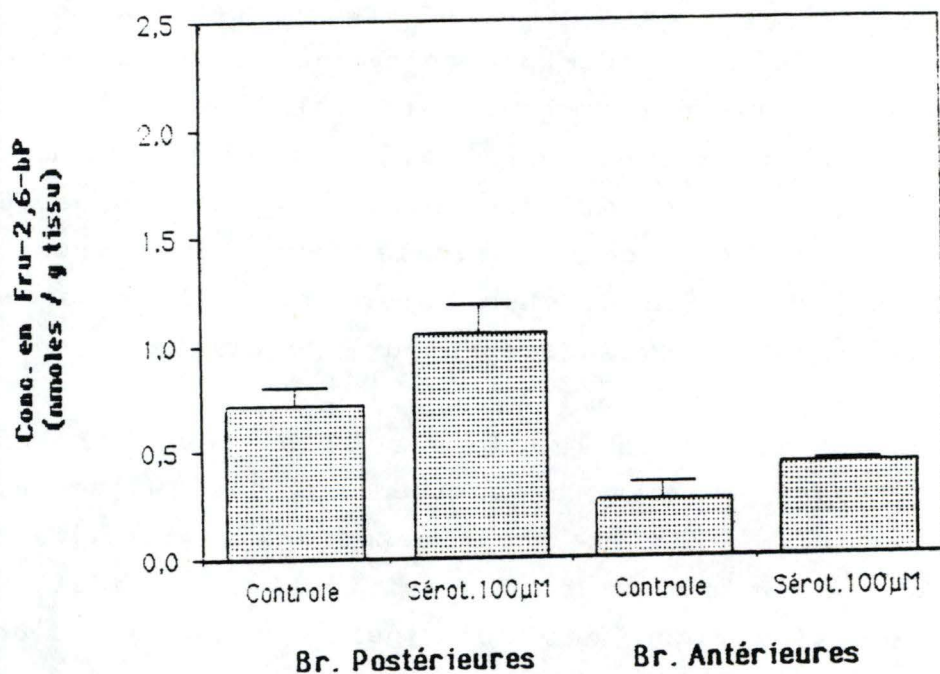


Figure 5: Concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=6) ou perfusées avec de la sérotonine 100µM (n=4). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 6 ou 4 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

N.B. Après avoir perfusé les branchies pendant 30 minutes avec la sérotonine  $10^{-4}M$ , celles-ci sont ensuite congelées dans l'azote liquide, puis stockées à  $-20^{\circ}C$  jusqu'au moment de l'homogénéisation en vue du dosage du Fru-2,6-bP, de l'ATP et de l'ADP. Il en ira de même avec la dopamine et le dbAMPc.

2.2 Action de la sérotonine sur la concentration en fructose-2,6-bisphosphate.

Les résultats des taux de Fru-2,6-bP dans les BP et les BA perfusées avec la sérotonine ( $10^{-4}M$ ) sont repris dans le tableau 3 ci-dessous et sont comparés aux taux de Fru-2,6-bP dans les branchies perfusées avec un Ringer "FW". La figure 5 permet de comparer graphiquement les moyennes des concentrations en Fru-2,6-bP.

Tableau 3

BP perf. (FW) (nmoles/gr)	BP perf. Sérot. (100 $\mu$ M) (nmoles/gr)	BA perf. (FW) (nmoles/gr)	BA perf. Sérot. (100 $\mu$ M) (nmoles/gr)
0,871	1,198	0,345	0,427
0,698	0,921	0,273	0,424
0,697	1,169	0,150	0,43
0,630	0,901	0,376	0,451
0,630		0,242	
0,775		0,189	
$\bar{X}=0,717$ $\sigma=0,085$ $\sigma^2=0,007$	$\bar{X}=1,047$ $\sigma=0,137$ $\sigma^2=0,019$	$\bar{X}=0,264$ $\sigma=0,078$ $\sigma^2=0,006$	$\bar{X}=0,433$ $\sigma=0,0106$ $\sigma^2=0,0011$

Après analyse statistique, nous pouvons constater le fait suivant: la sérotonine provoque une augmentation significative de la concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies. De fait, la concentration passe de 0,717 nmoles/gr tissu à 1,047 nmoles/gr tissu dans les BP, et de 0,264 nmoles/gr tissu à 0,433 nmoles/gr tissu dans les BA.

Le fait qu'il y ait élévation de la concentration en Fru-2,6-bP lorsqu'on perfuse des BP avec de la sérotonine  $10^{-4}M$  peut s'expliquer en fonction de ce qui a été dit précédemment.

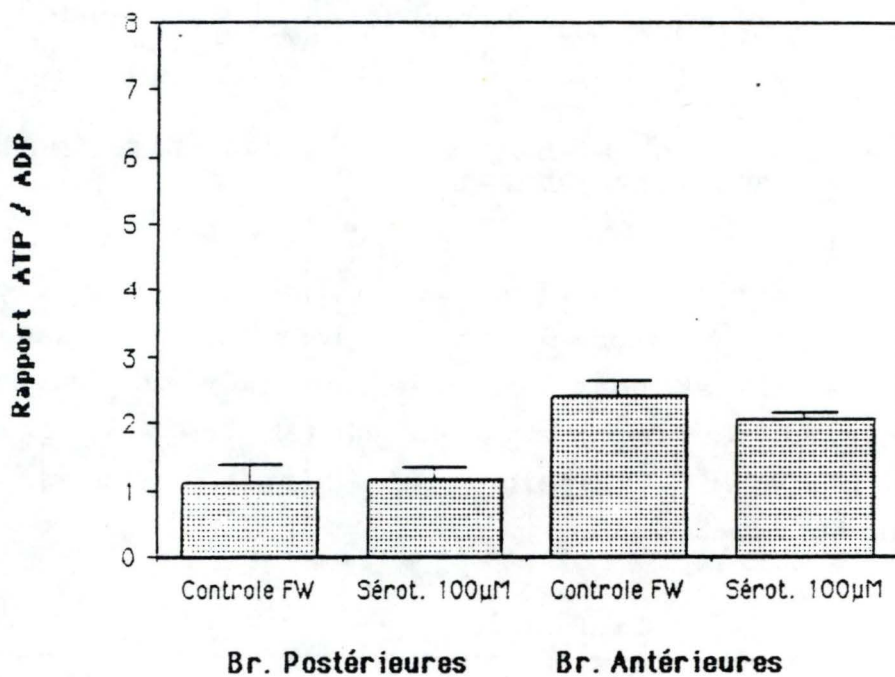


Figure 6 Rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=4) ou avec la sérotonine 100µM (n=4). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 4 branchies ± l'écart type (σ).

Nous venons de voir que la sérotonine change la ddp et donc modifie le transport ionique. Cette modification nécessiterait un surplus d'énergie qui se traduirait par une augmentation du flux glycolytique et donc par une hausse de la concentration en Fru-2,6-bP dans la branchie: cet effet se reproduit aussi bien dans les BP que dans les BA.

Ces résultats suggèrent un lien possible entre le transport ionique et la glycolyse, comme cela se présente chez les mammifères

### 2.3 Action de la sérotonine sur le rapport ATP/ADP.

Les résultats sont repris dans le tableau 4 ci-dessus et dans la figure 6 ci-contre.

Tableau 4

	ATP ( $\mu$ mole/gr)	ADP ( $\mu$ mole/gr)	ATP/ADP
B.Post. perf.(FW)	0,603+0,114 (n=4)	0,589+0,170 (n=4)	1,095+0,275 (n=4)
B.Post. perf.(FW) + Sérot. (100 $\mu$ M)	0,736+0,156 (n=4)	0,682+0,149 (n=4)	1,132+0,197 (n=4)
B.Ant. perf.(FW)	1,246+0,190 (n=4)	0,514+0,042 (n=4)	2,41+0,240 (n=4)
B.Ant. perf.(FW) + Sérot. (100 $\mu$ M)	1,15+0,085 (n=4)	0,567+0,014 (n=4)	2,032+0,142 (n=4)

On remarque que la sérotonine ne provoque pas une variation significative du rapport ATP/ADP aussi bien dans les BP que dans les BA. Les concentrations en ATP et en ADP restent statistiquement équivalentes à celles observées suite à la perfusion avec le Ringer "FW" seul. Le crabe chinois maintiendrait donc sa charge énergétique quasi constante en présence de bioamine.

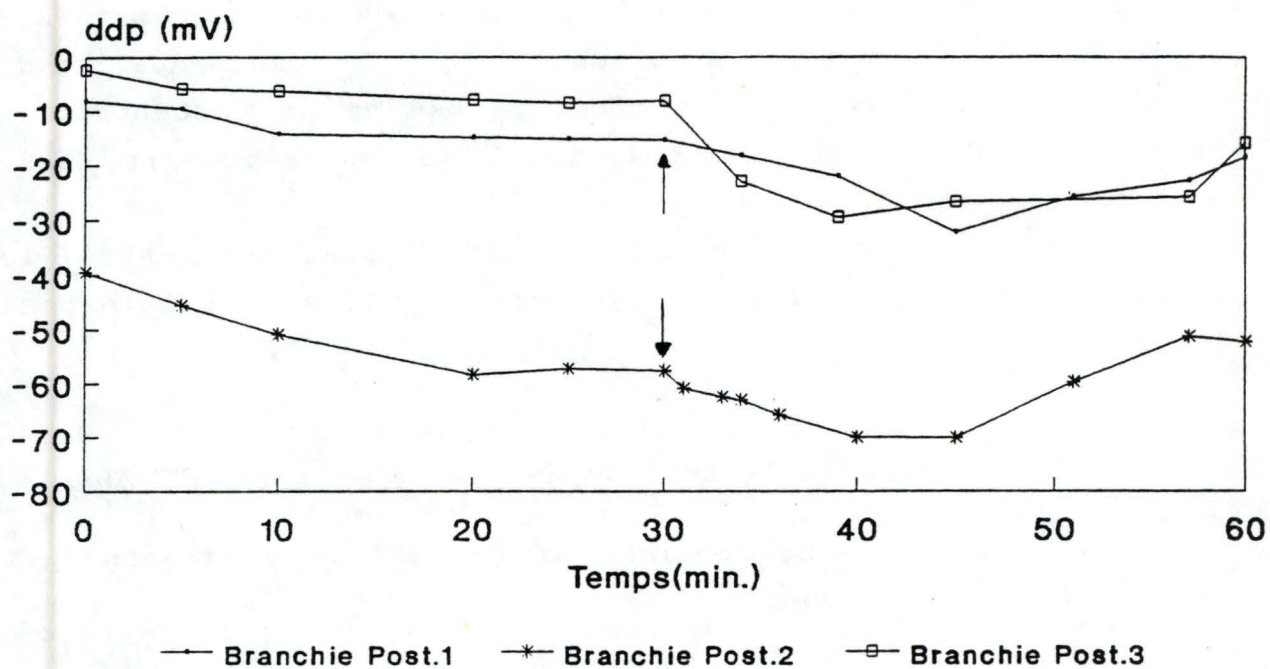


figure 7. Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale de 3 branchies postérieures (isolées et perfusées) de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce, lors de l'addition de dopamine  $10^{-4}M$  dans le milieu de perfusion ("In").

Or, l'augmentation de la concentration en Fru-2,6-bP qui a été décrite, conduirait à une activation de la voie glycolytique. Chez le crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, cette augmentation de l'activité glycolytique et du transport ionique dans la branchie ne modifie pas l'équilibre des concentrations en ATP et en ADP aussi bien dans les BP que dans les BA.

### 3. Effet de la dopamine.

#### 3.1 Action de cette bioamine sur la différence de potentiel.

Les conditions expérimentales restent identiques à celles décrites pour la sérotonine, aussi bien pour les branchies postérieures que pour les antérieures.

##### 3.1.1 au niveau des branchies postérieures.

Lorsque la dopamine ( $10^{-4}M$ ) est ajoutée au milieu de perfusion, la ddp évolue de la même façon qu'avec la sérotonine. La figure 7 ci-contre permet de visualiser un effet hyperpolarisant pour 3 branchies isolées de crabes acclimatés à l'eau douce.

Il apparaît toutefois que la dopamine a un effet plus marqué que la sérotonine: son action est plus intense et plus durable. Nous suivons le raisonnement décrit pour la sérotonine pour expliquer son effet sur la différence de potentiel. La dopamine modulerait le transport ionique en activant essentiellement la ( $Na^+ - K^+$ ) ATPase et les canaux à  $Cl^-$  situés à la face séreuse de l'épithélium. Le fait d'activer les pompes va provoquer une augmentation du flux entrant de  $Na^+$  et de  $Cl^-$ , mais aussi une activation du flux sortant de  $Cl^-$ . Dès lors, le potentiel au niveau de la face sérosale va devenir plus électronégatif, d'où l'effet hyperpolarisant observé.



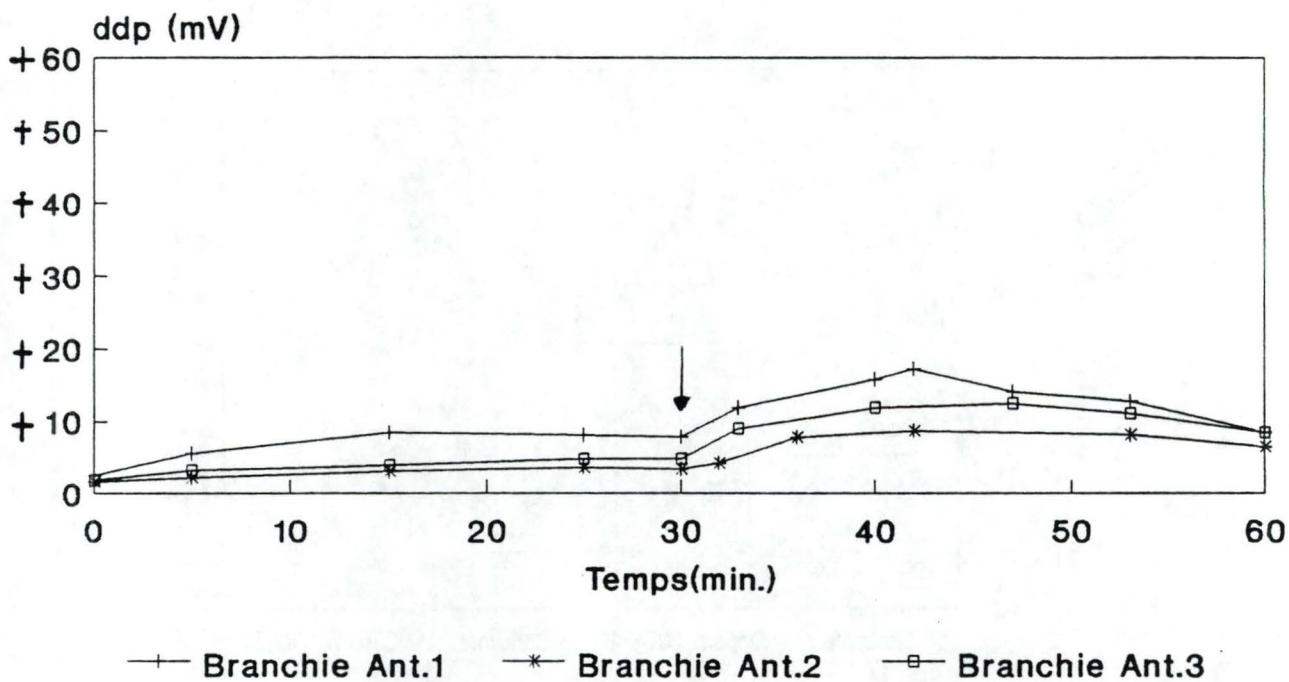


Figure 8. Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale de 3 branchies antérieures (isolées et perfusées) de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce, lors de l'addition de dopamine  $10^{-4}M$  dans la solution de perfusion ("In").

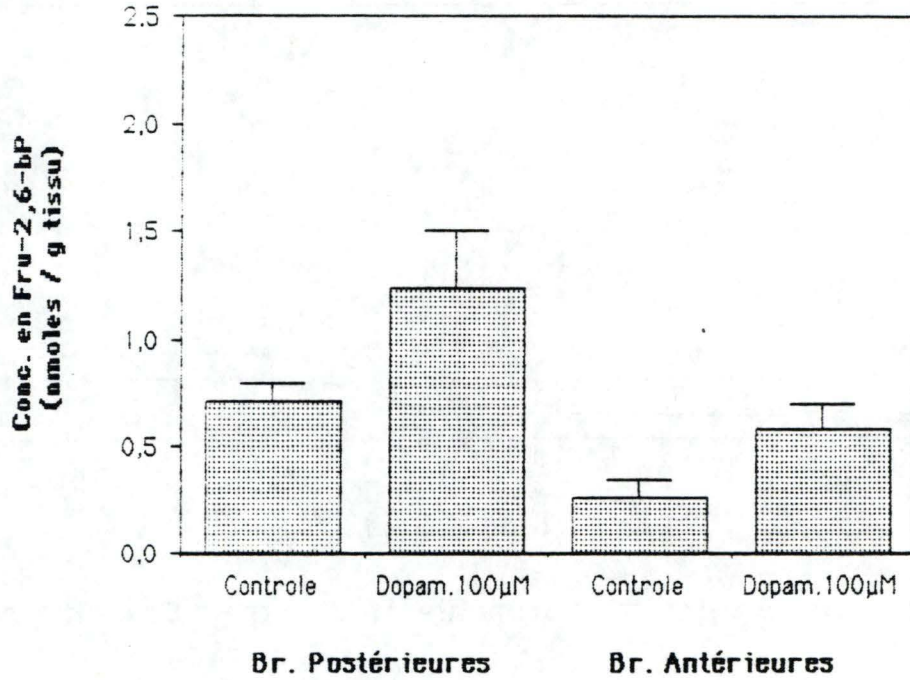


Figure 9: Concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=6) ou perfusées avec de la dopamine 100µM (n=4). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 6 ou 4 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

### 3.1.2 au niveau des branchies antérieures.

Si on ajoute dans la solution de perfusion de la dopamine ( $10^{-4}M$ ), la ddp reste toujours positive et augmente légèrement comme en témoigne la figure 8. L'hyperpolarisation observée dure 25 minutes et a tendance, lentement, à revenir à sa valeur initiale.

La dopamine modifie l'activité de transport ionique au niveau des BA, mais l'effet est apparemment moins important que dans les BP.

Ceci confirmerait le rôle spécifique des bioamines sur la mécanique de transport; comme celle-ci est moins sophistiquée dans les BA, l'action de la dopamine est moins prononcée.

### 3.2. Action de la dopamine sur la concentration en fructose-2,6-bisphosphate.

Les résultats des taux de Fru-2,6-bP dans les BP et BA perfusées avec de la dopamine ( $10^{-4}M$ ) sont repris dans le tableau 5 ci-dessous, et sont comparés aux taux de Fru-2,6-bP dans les branchies perfusées avec le liquide physiologique. La figure 9 compare les moyennes de concentration en Fru-2,6-bP.

Tableau 5

BP perf. (FW) (nmoles/gr)	BP perf. Dopam. ( $100\mu M$ ) (nmoles/gr)	BA perf. (FW) (nmoles/gr)	BA perf. Dopam. ( $100\mu M$ ) (nmoles/gr)
0,871	1,293	0,345	0,543
0,698	0,935	0,273	0,475
0,697	1,640	0,150	0,490
0,630	1,082	0,376	0,795
0,630		0,242	
0,775		0,189	
$\bar{X}=0,717$ $\sigma=0,085$ $\sigma^2=0,0072$	$\bar{X}=1,237$ $\sigma=0,269$ $\sigma^2=0,072$	$\bar{X}=0,264$ $\sigma=0,078$ $\sigma^2=0,006$	$\bar{X}=0,576$ $\sigma=0,129$ $\sigma^2=0,017$

Après analyse statistique, on constate que la dopamine augmente significativement la concentration en Fru-2,6-bP dans

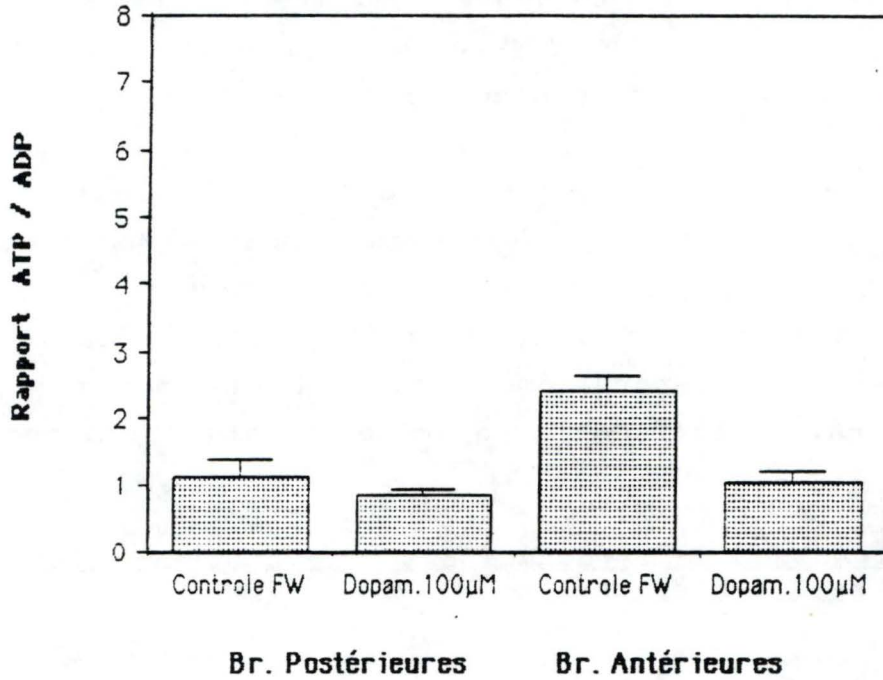


Figure 10 Rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=4) ou avec la dopamine 100µM (n=4). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 4 branchies ± l'écart type ( $\sigma$ ).

les deux types de branchies. Cette hausse est sans doute le reflet d'une activation du métabolisme basal de la branchie du crabe acclimaté à l'eau douce. Face à un stress hypoosmotique, la branchie doit s'adapter adéquatement pour lui résister; c'est pourquoi elle active le flux glycolytique en augmentant, sous l'influence des bioamines, la concentration en Fru-2,6-bP.

### 3.3 Action de la dopamine sur le rapport ATP/ADP.

Les résultats sont présentés dans le tableau 6, et repris sous forme d'histogramme dans la figure 10 .

Tableau 6

	ATP ( $\mu$ mole/gr)	ADP ( $\mu$ mole/gr)	ATP/ADP
B.Post. perf.(FW)	0,603+0,114 (n=4)	0,589+0,170 (n=4)	1,095+0,275 (n=4)
B.Post. perf.(FW) + Dopam. (100 $\mu$ M)	0,393+0,145 (n=4)	0,456+0,133 (n=4)	0,841+0,085 (n=4)
B.Ant. perf.(FW)	1,246+0,190 (n=4)	0,514+0,042 (n=4)	2,41+0,240 (n=4)
B.Ant. perf.(FW) + Dopam. (100 $\mu$ M)	0,560+0,20 (n=4)	0,499+0,161 (n=4)	1,039+0,132 (n=4)

On remarque que la dopamine entraîne une diminution significative de la concentration en ATP dans les branchies postérieures alors que le taux d'ADP ne change pratiquement pas. Le rapport ATP/ADP, lui, a tendance à diminuer mais cette baisse n'est pas statistiquement significative.

Dans les branchies antérieures, on observe le même effet au niveau concentrations individuelles en nucléotides. Par contre, le rapport ATP/ADP baisse de façon significative; En effet, on passe de 2,41 à 1,039 alors que dans les BP, on passe seulement de 1,095 à 0,841.

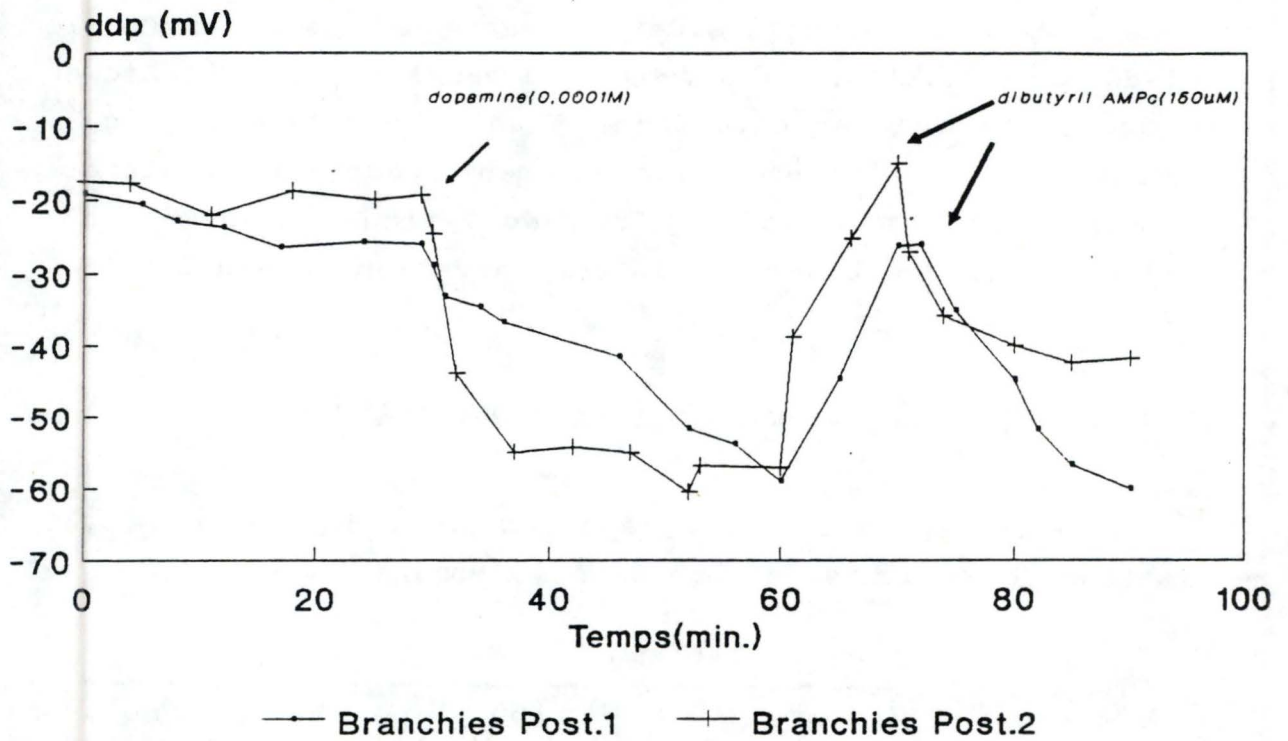


Figure 11. Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale de 2 branchies postérieures (isolées et perfusées) de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce, lors de l'addition successive de dopamine  $10^{-4}M$  et du dibutyryl AMP cyclique  $150 \mu M$  dans la solution de perfusion ("In").

Cette diminution plus importante dans la branchie antérieure peut difficilement s'expliquer actuellement.

#### 4.Effet du dbAMPc.

Nous avons réalisé une série d'expériences qui consistent à perfuser des branchies avec du dibutyryl AMP cyclique(dbAMPc),c'est-à-dire avec un messenger secondaire qui pourrait médier les effets des bioamines que nous venons d'observer pour des crustacés acclimatés à l'eau douce.

##### 4.1 Effet de la perfusion avec du dbAMPc sur la ddp.

Nous avons perfusé des BP et des BA pendant 30 minutes avec une solution physiologique "FW". Ensuite, nous ajoutons successivement au milieu de perfusion ("In") la dopamine  $10^{-4}M$  puis le dbAMPc  $150\mu M$ , 40 minutes après l'addition de la bioamine. On laisse agir le dbAMPc pendant 20 minutes. Entre les deux effecteurs du transport ionique, on réalise un lavage de la branchie avec du Ringer "FW" pendant 10 minutes. La ddp est prise régulièrement toutes les deux minutes pendant 1h 30 avec un électromètre comme décrit précédemment.

##### 4.1.1 au niveau des branchies postérieures.

En ajoutant successivement la dopamine, puis le dbAMPc au milieu "In", nous observons le même effet hyperpolarisant entre la bioamine et l'analogue du nucléotide cyclique (voir figure 11).

On confirme ainsi l'effet hyperpolarisant obtenu par Bianchini et Gilles (1989). De fait ces auteurs ont mis en évidence la participation de l'AMP cyclique dans la modulation du transport transépithélial de NaCl dans les BP du crabe chinois.

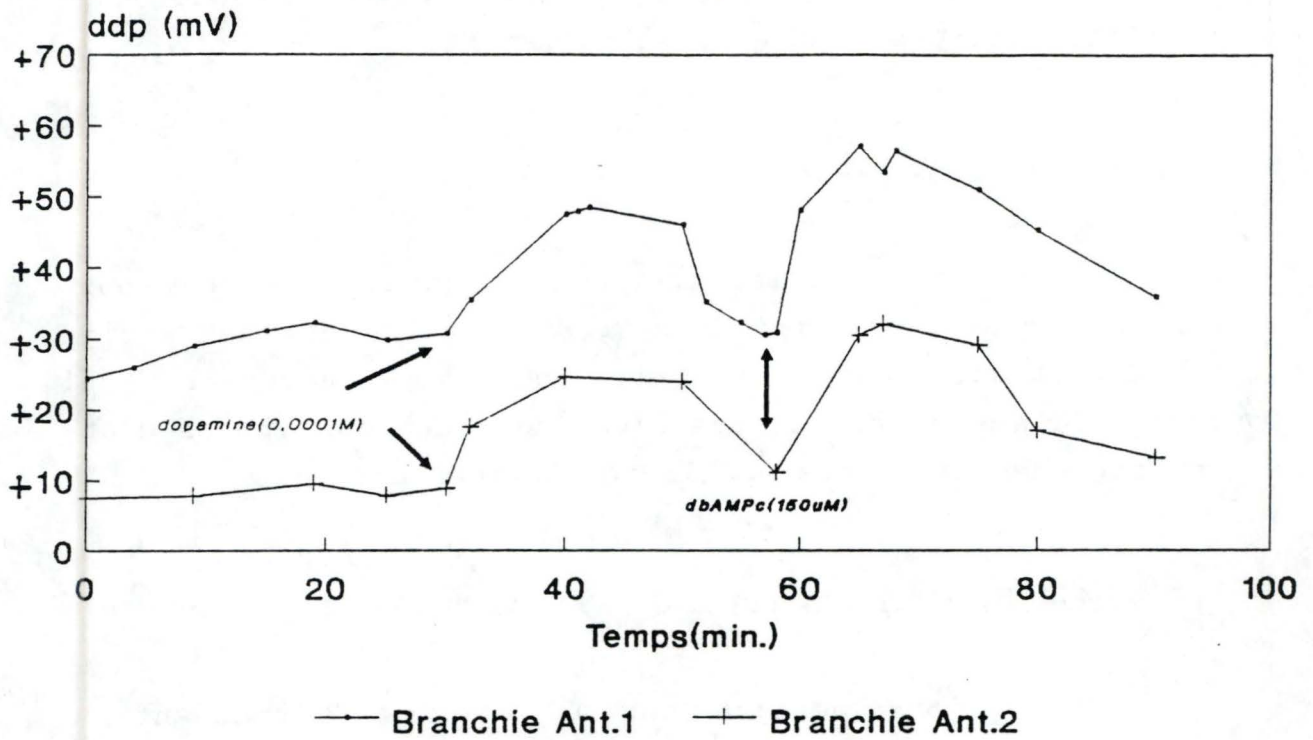


Figure 12. Variation, en fonction du temps, de la différence de potentiel électrique transépithéliale de 2 branchies antérieures (isolées et perfusées) de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce, lors de l'addition successive de dopamine  $10^{-4}M$  et du dibutyryl AMP cyclique  $150\mu M$  dans la solution de perfusion ("In").



Cugnon(1990) avait montré une augmentation significative de l'influx de  $\text{Na}^+$  en perfusant des BP avec du dbAMPc. De plus, l'AMPc entraîne une augmentation significative de l'influx sortant de  $\text{Cl}^-$  [Bianchini et Gilles, 1989]. On confirme cette action de la manière suivante: quand le  $\text{Cl}^-$  est remplacé par le gluconate dans le milieu d'incubation, l'addition de dbAMPc induit une nette hyperpolarisation (on passe de  $-25\text{mV}$  à  $+50\text{mV}$  avec le gluconate "Out" et l'on monte à  $+100\text{mV}$  avec le dbAMPc "In".).

#### 4.1.2 au niveau des branchies antérieures.

En perfusant ces branchies antérieures dans les mêmes conditions que ci-dessus, on observe le même effet hyperpolarisant (voir figure 12). La présence d'AMPc ("In") augmente la ddp même après addition de dopamine; l'effet garde la même intensité d'augmentation. Ceci était également valable chez les branchies postérieures.

Manifestement, le comportement des BA est identique à celui des BP. Un système dépendant de l'AMPc y serait également présent. Au sujet des flux ioniques, l'AMPc induit vraisemblablement les mêmes effets que ceux apportés par les bioamines, à savoir une augmentation du transport de  $\text{Na}^+$  de l'extérieur vers l'intérieur et une modulation de la ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) ATPase localisée sur la face interne de l'épithélium.

N.B. Après 90 minutes de perfusion, les branchies sont congelées, puis stockées à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au moment des dosages.

#### 4.2 Effet du dbAMPc sur la concentration en fructose-2,6-bisphosphate.

Les résultats des taux de Fru-2,6-bP dans les BP et BA perfusées sont repris dans le tableau 7 et sont comparés aux taux de Fru-2,6-bP respectifs dans les branchies contrôles.

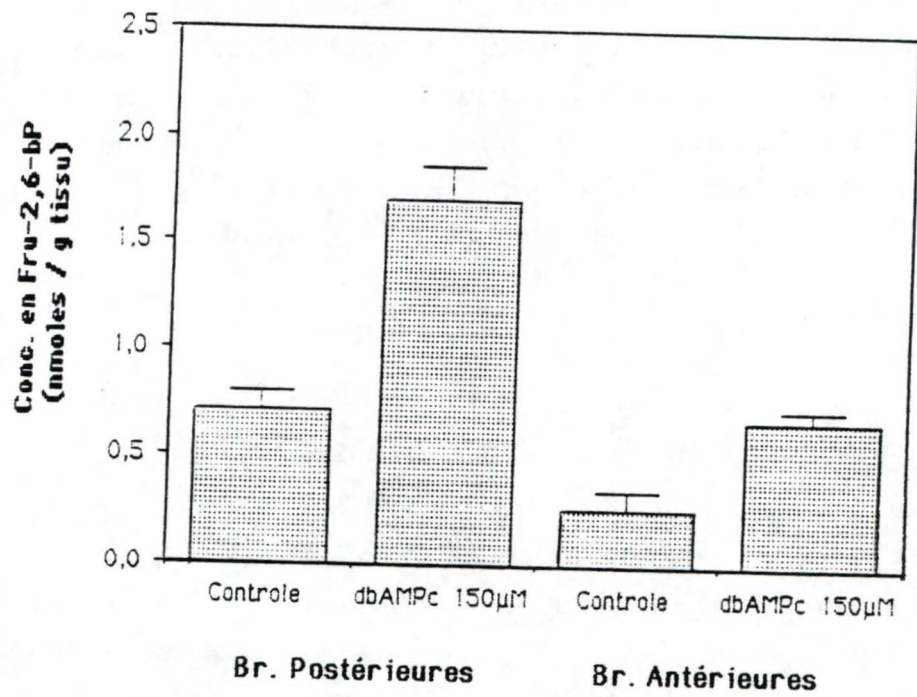


Figure 13: Concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=6) ou perfusées avec du db AMPc 150µM (n=2). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 6 ou 2 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

La figure 13 ci-contre compare graphiquement les moyennes des concentrations en Fru-2,6-bP.

Tableau 7

BP perf.(FW) (nmoles/gr)	BP perf. dbAMPc.(150µM) (nmoles/gr)	BA perf.(FW) (nmoles/gr)	BA perf. dbAMPc.(150µM) (nmoles/gr)
0,871	1,540	0,345	0,630
0,698	1,860	0,273	0,730
0,697		0,150	
0,630		0,376	
0,630		0,242	
0,775		0,189	
$\bar{X}=0,717$ $\sigma=0,085$ $\sigma^2=0,0072$	$\bar{X}=1,70$ ( $\sigma=0,160$ ) ( $\sigma^2=0,0256$ )	$\bar{X}=0,264$ $\sigma=0,078$ $\sigma^2=0,006$	$\bar{X}=0,680$ ( $\sigma=0,050$ ) ( $\sigma^2=0,0025$ )

La perfusion avec du dbAMPc entraine une augmentation significative de la concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies du crabe *Eriocheir sinensis*.

Au niveau des branchies postérieures, on confirme les résultats de Mellouki(1990); cette augmentation du taux de Fru-2,6-bP témoigne d'une stimulation de la glycolyse, vraisemblablement via un système de modifications covalentes(phosphorylation/dé-phosphorylation). Comme signalé dans l'introduction, l'AMPc est un messenger intracellulaire qui vient se fixer sur l'unité régulatrice de la protéine kinase A, ce qui provoque la libération de la sous-unité catalytique de l'enzyme qui peut alors phosphoryler le système PFK-2/FBPase-2, entraînant une augmentation de la concentration en ester bisphosphaté. En perfusant avec la dopamine, on amplifie ce processus de cascade réactionnelle puisque l'AMPc interviendrait comme médiateur de l'action des bioamines chez les crustacés.

#### 4.3. Effet du dbAMPc sur le rapport ATP/ADP.

Les résultats sont présentés dans le tableau 8 et repris sous forme d'histogramme dans la figure 14.

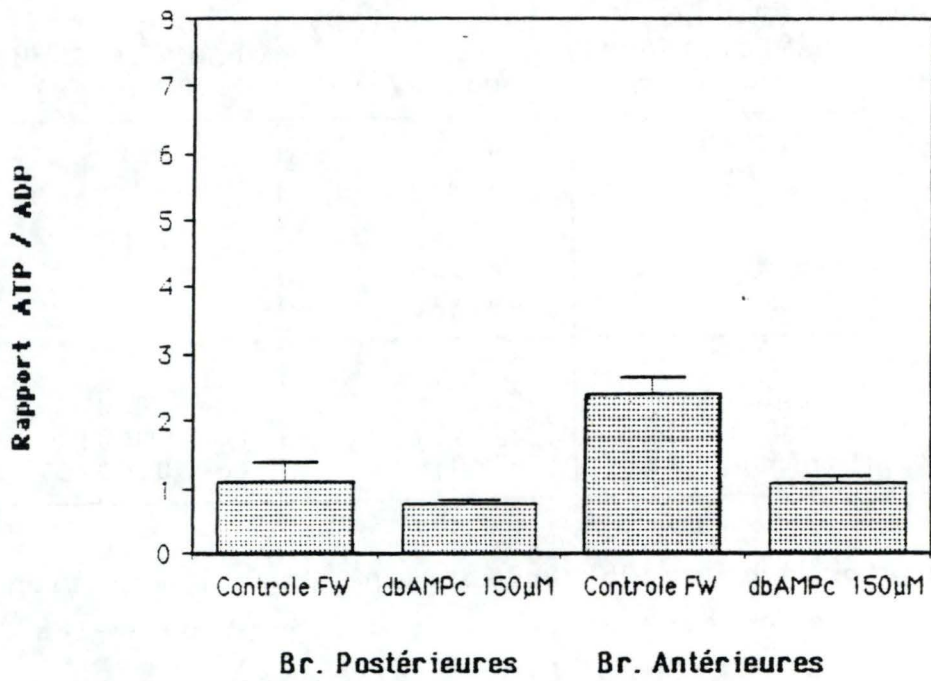


Figure 14 Rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=4) ou avec du dbAMPc 150µM (n=2). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 4 ou de 2 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

Tableau 8

	ATP ( $\mu\text{mole/gr}$ )	ADP ( $\mu\text{mole/gr}$ )	ATP/ADP
B.Post.perf(FW)	0,603+0,114 (n=4)	0,589+0,170 (n=4)	1,095+0,275 (n=4)
B.Post. perf. dbAMPc (150 $\mu\text{M}$ )	0,084+0,007 (n=2)	0,112+0,001 (n=2)	0,742+0,070 (n=2)
B.Ant.perf.(FW)	1,246+0,190 (n=4)	0,514+0,042 (n=4)	2,41+0,240 (n=4)
B.Ant. perf. dbAMPc (150 $\mu\text{M}$ )	0,185+0,05 (n=2)	0,181+0,068 (n=2)	1,066+0,111 (n=2)

On remarque que le dbAMPc occasionne une chute significative de la concentration en ATP, de la concentration en ADP et du rapport dans les deux types de branchies.

Il est logique que le rapport diminue dans les BP puisque ces branchies sont engagées dans les processus actifs du transport ionique: l'énergie produite sous forme d'ATP est utilisée à cette fin.

### 5. Conclusions.

Nous venons de montrer que les bioamines sont étroitement impliquées dans le transport ionique au niveau des branchies du crabe décapode euryhalin *Eriocheir sinensis*.

La sérotonine, et plus efficacement la dopamine, modulent l'activité de transport ionique en provoquant dans les deux types de branchies un effet hyperpolarisant qui s'explique différemment suivant le tissu branchial:

# Dans les BP, l'action des bioamines se comprend si on accepte une activation de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et des canaux à  $\text{Cl}^-$  situés du côté séreux. De fait, la dopamine agit bien du côté de l'hémolymphe: une expérience a été réalisée en plaçant la dopamine dans le milieu "Out" et aucune variation de la ddp

n'a été détectée, ce qui confirme son lieu d'action. (résultats non montrés)

# Dans les BA, l'action des bioamines se limiterait à l'activation de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , également localisée à la face interne, et à l'augmentation du mouvement entrant de  $\text{Na}^+$ .

Des expériences réalisées par Gilles et ses collaborateurs (1986) concernant l'effet de la variation de la teneur en  $\text{K}^+$  dans la solution de perfusion confirment l'existence d'un potentiel de diffusion pour cet ion qui est à la base de la mécanique de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  aussi bien dans les BP que dans les BA du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

D'autre part, on remarque que l'effet des bioamines, du moins pour la dopamine, va dans le même sens que celui du dbAMPc, ce qui laisse présager l'existence d'un contrôle de l'activité des pompes par l'intermédiaire d'un messenger secondaire.

Ce système dépendant de l'AMPc peut également expliquer l'augmentation de la concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies. On peut de fait supposer une stimulation de la glycolyse en perfusant les branchies avec des bioamines et en présence de dbAMPc.

Comme ce dernier a un effet activateur sur le taux de Fru-2,6-bP, nous suggérons et nous appuyons l'hypothèse selon laquelle les neurohormones (sérotonine et dopamine) fonctionnent par le biais d'un médiateur intracellulaire qui peut induire des changements d'activité enzymatique par phosphorylation, et notamment celui du système PFK-2/FBPase-2, responsable de la synthèse du Fru-2,6-bP.

La question que l'on se pose maintenant est de savoir si le métabolisme des branchies est toujours aussi intense dans des conditions expérimentales particulières où les branchies ne transportent pas.

Comme on observe les mêmes phénomènes dans les branchies postérieures et dans les branchies antérieures, il est vraisemblable que la glycolyse ne soit pas directement liée au transport ionique.

Pour tenter de répondre à la question, on a réalisé une série d'études en modifiant nos conditions expérimentales de départ. L'intérêt de ces expériences ainsi que les résultats qui en découleront vont être présentés dans le chapitre qui suit.

## CHAPITRE III

EFFET DE LA PERFUSION AVEC UN RINGER "EAU DE MER" ET INFLUENCE DE LA DOPAMINE ("SW") SUR L'ACTIVITE DE TRANSPORT, LA CONCENTRATION EN FRU-2,6-BP ET SUR LE RAPPORT ATP/ADP AU NIVEAU DES BRANCHIES DU CRABE *ERIOCHEIR SINENSIS* ACCLIMATE A L'EAU DOUCE.

### 1. Introduction

Nous venons de voir dans le chapitre précédent l'influence des bioamines sur la mécanique de transport et sur le métabolisme énergétique du crabe *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce. Rien ne prouve actuellement un lien direct de cause à effet entre l'augmentation de l'activité des processus de transport actif et la stimulation de la voie glycolytique, puisque nous retrouvons aussi bien du côté des BP que du côté des BA les mêmes manifestations physiologiques et métaboliques.

Comme les BP montrent une plus grande activité métabolique et un important transport actif d'ions en eau douce par rapport à un milieu "SW", alors que l'épithélium des BA reste typiquement respiratoire quelle que soit les conditions environnementales, nous nous proposons de perfuser des BP et des BA avec une solution "SW" en présence de dopamine. L'idée est de connaître si l'augmentation du transport ionique est la cause ou la conséquence de la stimulation de la glycolyse, ou si on a affaire à un effet mixte.

L'intérêt de ces expériences est donc de voir, comment se comporte la ddp et les deux indicateurs (Fru-2,6-bP et rapport ATP/ADP) lorsqu'on perfuse des BP et des BA en présence:

a. d'un Ringer "SW".

b. d'un Ringer "SW" auquel on ajouté la dopamine (+ le dbAMPc) à une concentration  $10^{-4}$ M, dans le milieu "In".



## 2.Effet de la perfusion et rôle de la dopamine.

### 2.1 Influence de la dopamine en "SW" sur la ddp.

Nous avons perfusé des branchies postérieures et des branchies antérieures avec une solution saline "Eau de mer" pendant 30 minutes. Ensuite nous ajoutons au milieu de perfusion la dopamine  $10^{-4}M$  et nous la laissons agir pendant 15 minutes. Pour certaines branchies, on a également combiné la bioamine avec le dibutyryl AMP cyclique ( $100\mu M$ ), ce dernier étant ajouté au milieu "In", 10 minutes après l'addition de dopamine. La différence de potentiel est prise régulièrement toutes les deux minutes pendant 1 heure, suivant les conditions décrites précédemment.

La figure 15 reprend les résultats des perfusions avec les deux effecteurs additionnés successivement dans le milieu de perfusion.

#### 2.1.1 au niveau des branchies postérieures.

En perfusant des BP avec un Ringer "SW", la ddp tombe vers des valeurs proches de zéro. De fait, si ces branchies sont perfusées avec une solution saline "Eau de mer", la composition ionique de celle-ci correspond à celle de l'hémolymphe de crabes acclimatés à l'eau de mer: les influx de  $Na^+$  deviennent négligeables, quelles que soient les concentrations en cet ion du milieu extérieur. Gilles et Péqueux (1981 et 1985) ont prouvé que l'activité du/des mécanisme(s) de transport ionique est sensible à la concentration en  $Na^+$  de l'hémolymphe (ou dans la solution de perfusion), et que l'élévation de la concentration sanguine en  $Na^+$ , qui se produit en eau de mer, suffit à elle seule à interrompre de manière durable son/leur activité.

La concentration en  $Na^+$  dans le sang ou dans le milieu "In" peut agir comme un mécanisme déclenchant l'arrêt ou l'activité des pompes branchiales. Cependant, l'activité de celles-ci n'est pas seulement régulée par la variation du niveau de  $Na^+$  dans le milieu intérieur.

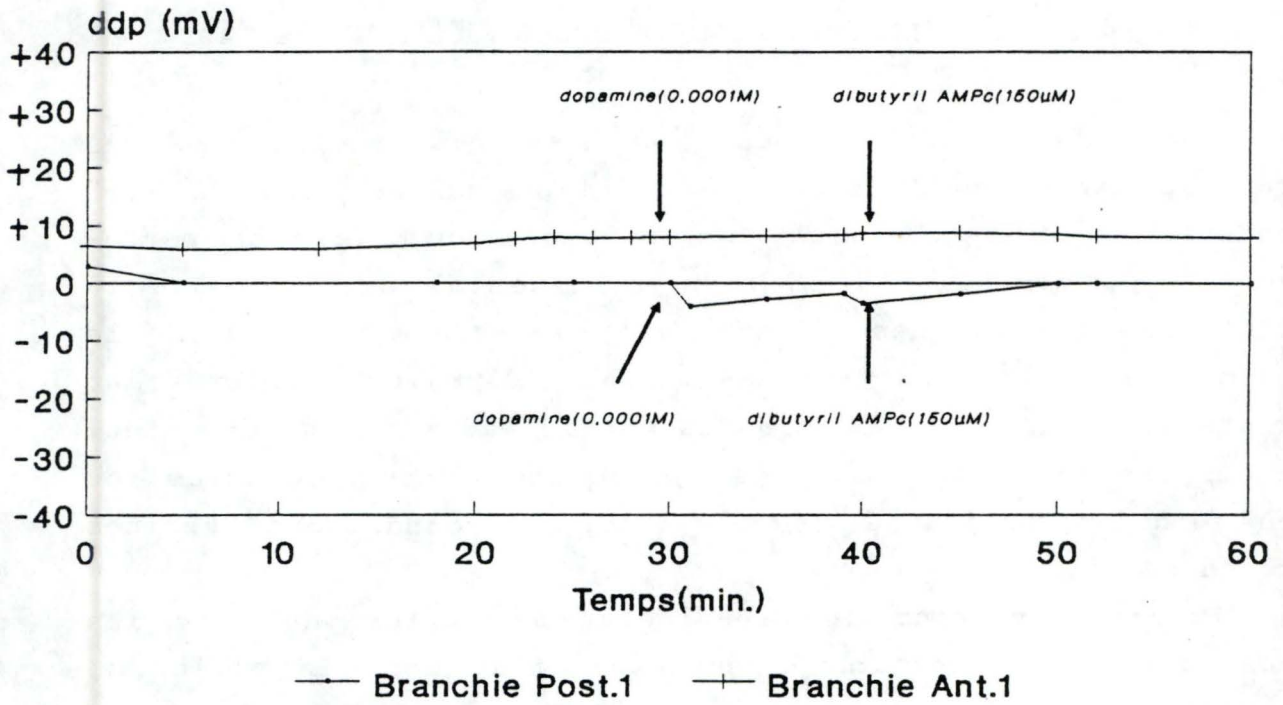


Figure 15. Effet combiné de la dopamine  $10^{-4}M$  et du dibutyryl AMP cyclique  $150\mu M$  sur la différence de potentiel électrique transépithéliale d'une branchie postérieure et d'une branchie antérieure isolées et perfusées avec un Ringer "Eau de mer", du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce. La dopamine et le dbAMPc sont ajoutés au milieu de perfusion ("In").

En réalité, il n'y a pas d'activité perceptible de transport dans les BP de crabes acclimatés à l'eau de mer, perfusées soit avec une solution "FW" ou avec un Ringer "SW"; cela se vérifie quel que soit le taux de  $\text{Na}^+$  dans le milieu "Out". L'acclimatation à un milieu non dilué conduit à une disparition des sites de transport et à une perte progressive de la capacité d'échanges actifs [Péqueux et Gilles, 1986].

Nous confirmons cette perte d'activité du transport actif dans les BP et nous remarquons en plus que la dopamine n'a plus d'influence significative sur la ddp comme le montre la figure 15; un léger effet hyperpolarisant est toutefois perceptible.

### 2.1.2 au niveau des branchies antérieures.

Quand on examine la figure 15, on remarque que la ddp des BA est quasi inchangée par rapport à celle obtenue en milieu "FW". La ddp est toujours positive et se maintient à un niveau constant dès le début de la perfusion. On peut expliquer cette constatation en rappelant les conclusions des observations faites par Péqueux et Gilles (1981). Ces auteurs ont remarqué que l'amplitude des flux unidirectionnels de  $\text{Na}^+$  augmente considérablement en "Sea water". Elle atteint en outre un niveau largement supérieur à celui mesuré dans les mêmes conditions expérimentales sur les branchies antérieures d'un crabe d'eau douce, suggérant que la perméabilité du  $\text{Na}^+$  a dû diminuer de façon significative lors de l'acclimatation prolongée à l'eau douce. Ceci contribue donc à maintenir la ddp positive à un niveau constant.

D'autre part, la dopamine additionnée au milieu de perfusion n'a plus d'effet hyperpolarisant sur la ddp qui reste stable.

La dopamine peut ainsi intervenir dans la contribution du mécanisme de réajustement de la perméabilité au  $\text{Na}^+$ , processus assurant le contrôle de l'osmolalité sanguine.

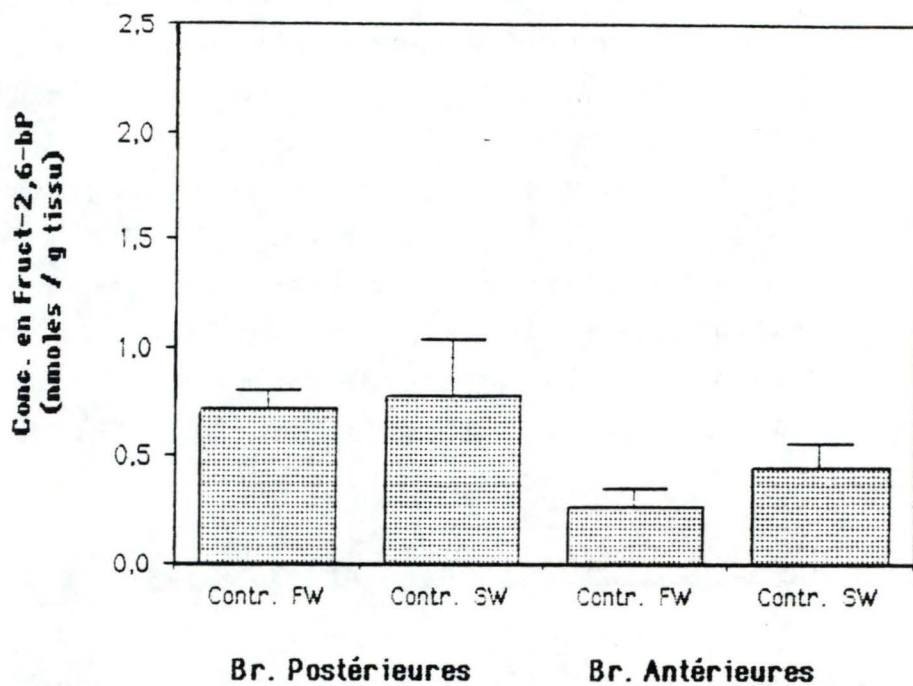


Figure 16: Concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=6) ou perfusées avec un Ringer "SW" (n=2). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 6 ou 2 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

## 2.2 Effet de la perfusion sur la concentration en fructose-2,6-bisphosphate.

### 2.2.1 influence du Ringer "SW".

Les résultats des taux de Fru-2,6-bP dans les BP et les BA perfusées avec un liquide physiologique "SW" sont repris dans le tableau 9 ci-dessous et sont comparés aux taux de Fru-2,6-bP dans les BP et les BA perfusées avec une solution "FW". La figure 16 ci-contre permet de comparer graphiquement les moyennes des concentrations en Fru-2,6-bP.

Tableau 9

BP perf.(FW) (nmoles/gr)	BP perf.(SW) (nmoles/gr)	BA perf.(FW) (nmoles/gr)	BA perf.(SW) (nmoles/gr)
0,871 0,698 0,697 0,630 0,630 0,775	1,011 0,511	0,345 0,272 0,150 0,376 0,242	0,338 0,559
$\bar{X}=0,717$ $\sigma=0,0850$ $\sigma^2=0,007$	$\bar{X}=0,781$ ( $\sigma=0,250$ ) ( $\sigma^2=0,0625$ )	$\bar{X}=0,264$ $\sigma=0,078$ $\sigma^2=0,006$	$\bar{X}=0,449$ ( $\sigma=0,111$ ) ( $\sigma^2=0,012$ )

La perfusion avec un Ringer "SW" entraîne une diminution de la concentration en Fru-2,6-bP mais cet effet n'est pas significativement plus important que celui observé quand on perfuse les deux types de branchies, du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce, avec un Ringer "FW"; le taux de Fru-2,6-bP a même tendance à augmenter. En tout cas, lorsque nous diminuons le transport ionique (en perfusant avec du "SW"), on ne modifie pas la chute du Fru-2,6-bP, que ce soit pour les BA que pour les BP.

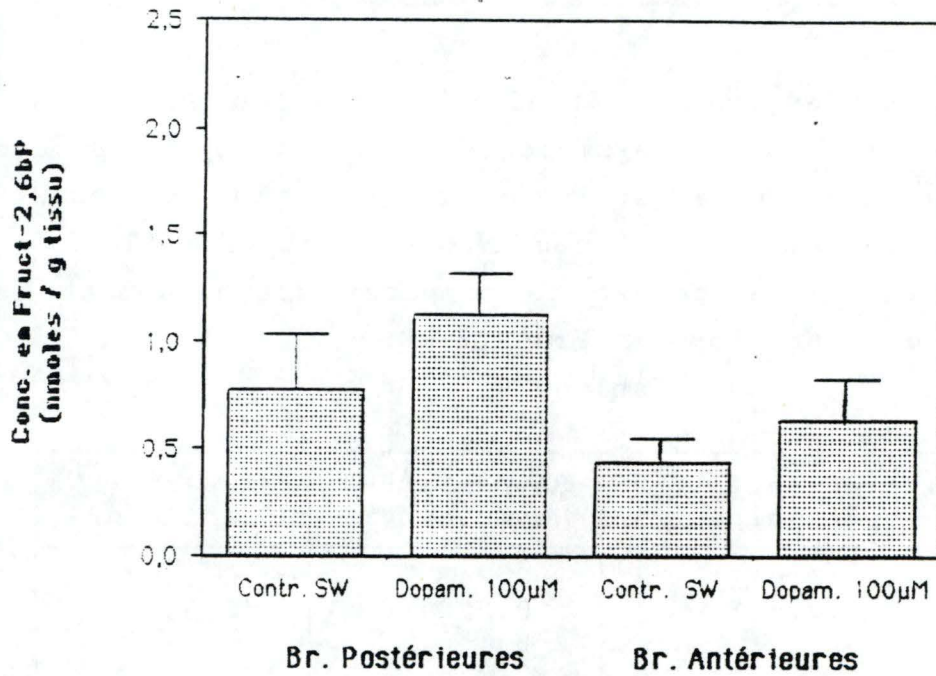


Figure 17: Concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "SW" (n=2) ou perfusées avec de la dopamine (100µM) en présence du Ringer "SW" (n=5). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 2 ou 5 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

### 2.2.2 Influence de la dopamine

Les résultats des taux de Fru-2,6-bP dans les BP et les BA perfusées avec de la dopamine  $10^{-4}M$  dans un milieu "SW" sont présentés dans le tableau 10 ci-dessous et sont comparés aux taux de Fru-2,6-bP dans les branchies contrôles, perfusées avec la solution "SW". La figure 17 compare graphiquement les moyennes des concentrations en Fru-2,6-bP.

Tableau 10

BP perf.(SW) (nmoles/gr)	BP perf.(SW) Dopam.(100 $\mu$ M) (nmoles/gr)	BA perf.(SW) (nmoles/gr)	BA perf.(SW) Dopam.(100 $\mu$ M) (nmoles/gr)
1,011 0,511	1,350 1,060 1,345 0,945 0,877	0,388 0,559	0,658 0,542 0,677 0,610 0,410
$\bar{X}=0,781$ ( $\sigma=0,250$ ) ( $\sigma^2=0,0625$ )	$\bar{X}=1,116$ $\sigma=0,199$ $\sigma^2=0,039$	$\bar{X}=0,449$ ( $\sigma=0,111$ ) ( $\sigma^2=0,012$ )	$\bar{X}=0,639$ $\sigma=0,182$ $\sigma^2=0,033$

La dopamine  $10^{-4}M$  augmente significativement la concentration en Fru-2,6-bP dans les deux types de branchies perfusées avec une solution "SW". Cette augmentation est le reflet d'une stimulation de la voie glycolytique aussi bien dans les BP que dans les BA. Or, nous avons vu précédemment que le transport ionique n'est pratiquement pas modifié par la dopamine en milieu "SW". Ceci signifierait que l'énergie produite lors de l'activation de la glycolyse par des bioamines peut être indépendante de l'activité de transport ionique.

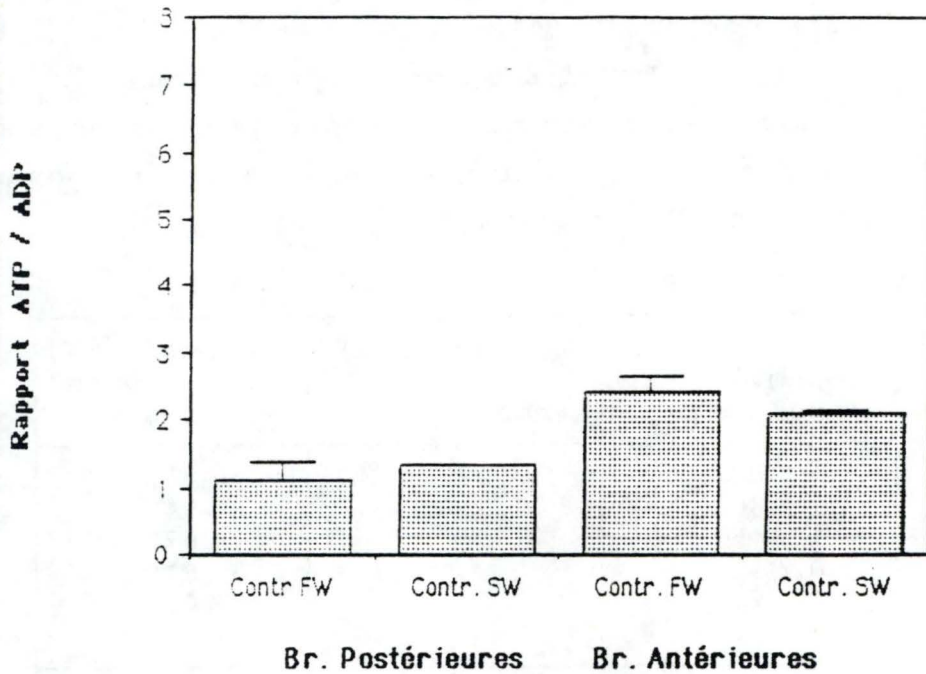


Figure 18 Rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "FW" (n=4) ou avec un Ringer "SW" (n=2). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 4 ou de 2 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).



2.3 Effet de la perfusion avec un Ringer "SW" sur le rapport ATP/ADP.

2.3.1 Influence du Ringer seul.

Les résultats sont présentés dans le tableau 11 ci-dessous et repris sous forme graphique dans la figure 18.

Tableau 11

	ATP ( $\mu$ mole/gr)	ADP ( $\mu$ mole/gr)	ATP/ADP
B.Post.perf.(FW)	0,603+0,114 (n=4)	0,589+0,171 (n=4)	1,095+0,275 (n=4)
B.Post. perf.(SW)	0,245+0,025 (n=2)	0,184+0,015 (n=2)	1,328+0,027 (n=2)
B.Ant.perf.(FW)	1,246+0,190 (n=4)	0,514+0,042 (n=4)	2,41+0,240 (n=4)
B.Ant. perf.(SW)	1,199+0,101 (n=2)	0,592+0,081 (n=2)	2,085+0,460 (n=2)

La perfusion avec un Ringer "SW" ou avec un Ringer "FW" n'entraîne pas de différence dans le rapport ATP/ADP aussi bien dans les BP que dans les BA. Les résultats obtenus pour les BP perfusées avec une solution "SW" nous paraissent faussés, du moins pour les concentrations individuelles en nucléotides qui sont anormalement basses; c'est probablement dû au faible nombre d'observations.

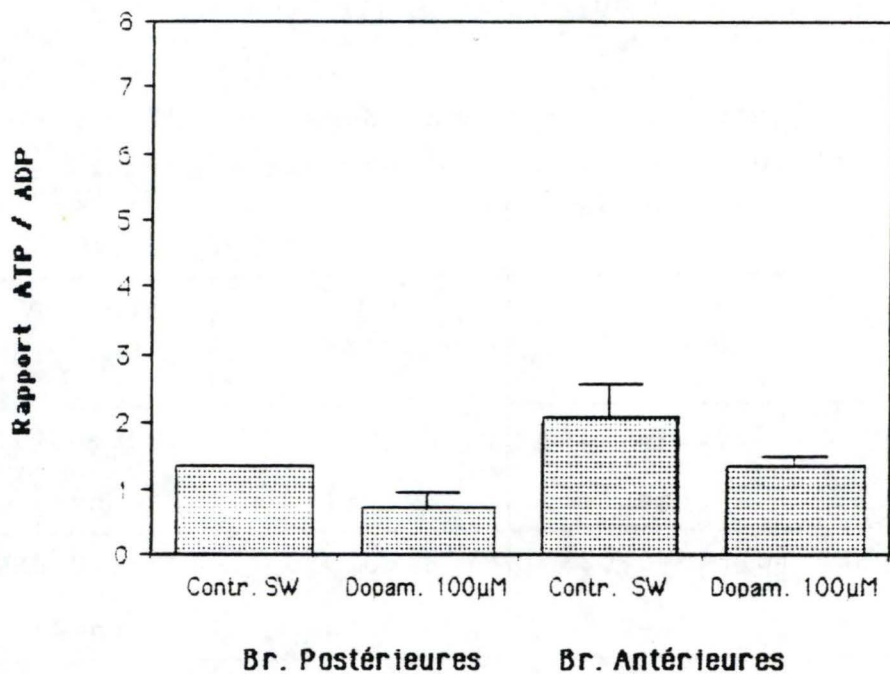


Figure 19 Rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies (postérieures et antérieures) perfusées avec un Ringer "SW" (n=2) ou avec de la dopamine en présence de Ringer "SW" (n=5). Chaque colonne représente la moyenne obtenue à partir de 2 ou de 5 branchies  $\pm$  l'écart type ( $\sigma$ ).

### 2.3.2 Influence de la dopamine

Les résultats sont présentés dans le tableau 12 et repris dans la figure 19 ci-contre.

Tableau 12

	ATP ( $\mu$ mole/gr)	ADP ( $\mu$ mole/gr)	ATP/ADP
B.Post.perf(SW)	0,245+0,025 (n=2)	0,184+0,015 (n=2)	1,328+0,027 (n=2)
B.Post. perf.(SW) + Dopam.(100 $\mu$ M)	0,482+0,209 (n=5)	0,669+0,097 (n=5)	0,709+0,251 (n=5)
B.Ant.perf(SW)	1,199+0,101 (n=2)	0,592+0,081 (n=2)	2,085+0,460 (n=2)
B.Ant. perf.(SW) + Dopam.(100 $\mu$ M)	0,898+0,165 (n=5)	0,659+0,070 (n=5)	1,354+0,130 (n=5)

La dopamine  $10^{-4}$ M, ajoutée au milieu de perfusion("SW"), induit une diminution significative du rapport ATP/ADP dans les deux types de branchies. Cette baisse est comparable à celle obtenue en milieu "Eau douce".

Si on tient compte de la remarque précédente, cette diminution du rapport est quelque peu atténuée chez les branchies postérieures, ce qui reflète plus la réalité.

Ainsi donc, dans des conditions expérimentales où la branchie ne transporte pas d'ions, la dopamine est toujours capable "d'activer" la glycolyse et de réduire le rapport ATP/ADP, et de façon identique dans les deux types de branchies.

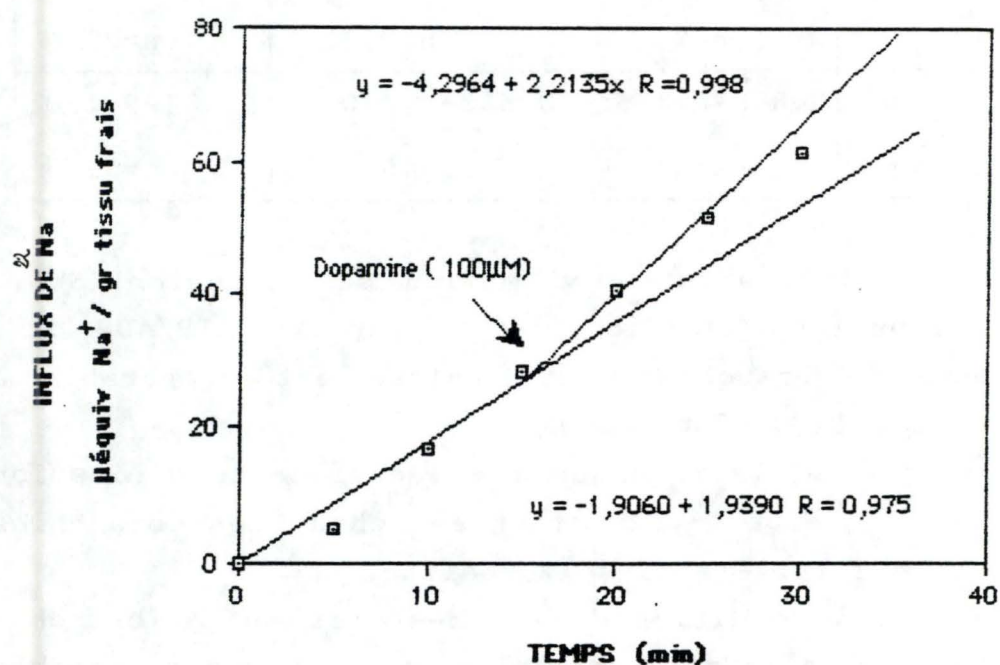
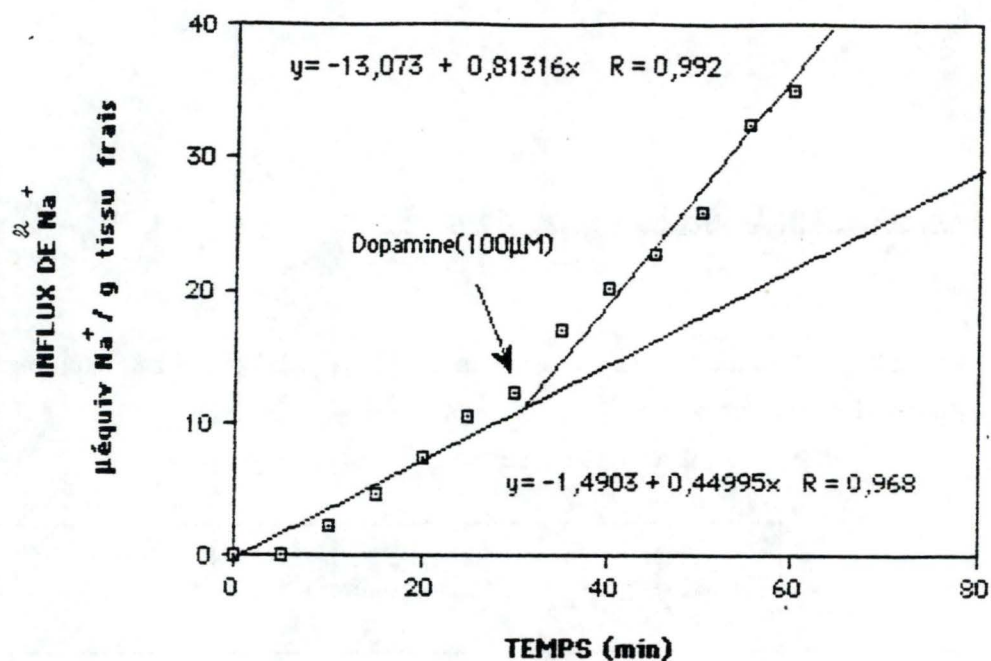


Figure 20 : Effet de la dopamine (100 μM) sur l'influx de Na<sup>+</sup> au niveau de branchies postérieures (isolées et perfusées) de crabes acclimatés à l'eau douce. La dopamine est ajoutée au milieu de perfusion "In", et le <sup>22</sup>Na dans la solution d'incubation "Out".

## CHAPITRE IV

### INFLUENCE DES BIOAMINES SUR LES FLUX IONIQUES.

#### 1. Introduction.

Nous venons de montrer l'effet de la dopamine sur le transport ionique: l'effet au niveau des BP supposerait une action sur les flux de  $\text{Cl}^-$  ou sur la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$  ATPase avec une augmentation du flux de  $\text{Na}^+$ .

Nous avons voulu confirmer cette hypothèse en déterminant l'influence de cette bioamine sur le flux ionique, et plus particulièrement sur le flux entrant de  $\text{Na}^+$  au niveau des branchies postérieures. L'intérêt de ces études est de confirmer, dans le cadre de notre travail, l'influence des bioamines dans la modulation du transport ionique au niveau des branchies du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

#### 2. Mesure du flux entrant de $^{22}\text{Na}$ sous l'effet de la dopamine dans les BP perfusées avec un Ringer "FW".

On perfuse des branchies postérieures avec une solution "FW" pendant 10 minutes, temps nécessaire pour stabiliser la ddp. Ensuite, nous ajoutons au milieu d'incubation le traceur radioactif comme expliqué dans le point 5 du chapitre III de Matériel et Méthodes. Après 30 minutes pour la première branchie postérieure et 15 minutes pour la seconde, on ajoute dans le milieu "In" la dopamine  $10^{-4}\text{M}$ . L'influx de  $\text{Na}^+$  est alors mesuré en prélevant, toutes les 5 minutes, dans des fioles en plastique, le milieu de perfusion via le cathéter efférent.

L'addition de dopamine  $10^{-4}\text{M}$  à la solution de perfusion induit une augmentation du flux entrant de  $^{22}\text{Na}$ . On passe d'une valeur de  $25\mu\text{éq/g tissu/h}$  à  $50\mu\text{éq/g tissu/h}$  pour la première branchie et de  $110\mu\text{éq/g tissu/h}$  à  $140\mu\text{éq/g tissu/h}$  pour la seconde branchie (voir figure 20).

Cette augmentation confirme les résultats obtenus par Bianchini(1989) et Cugnon(1990) qui montraient une augmentation du flux entrant de  $^{22}\text{Na}$  lorsqu'ils perfusaient des branchies postérieures avec du dbAMPc. Cependant, ce flux entrant de sodium décrit par ces auteurs est supérieur à nos valeurs présentées. De fait, l'influx normal de  $^{22}\text{Na}$  dans les BP du crabe acclimaté à l'eau douce est de l'ordre de 200 à 300  $\mu\text{eq/g}$  tissu/h. Dans notre expérience, on atteint en moyenne la valeur de 60  $\mu\text{eq/g}$  tissu/h. Ce taux peu élevé est sans doute lié au fait que cette expérience est réalisée à un moment (mimars) où la ddp des branchies postérieures devient de moins en moins négative et à même tendance à s'inverser; on est en quelque sorte dans une situation proche de celle créée avec le "SW", où la branchie transporte beaucoup moins. Cela n'empêche pas la dopamine d'agir car, même avec un flux très bas initialement, on constate une augmentation de près de 50% de l'influx de  $\text{Na}^+$ .

Ceci appuie donc l'hypothèse selon laquelle les bioamines modulent l'activité de transport ionique, et plus particulièrement le flux de  $^{22}\text{Na}$ , dans les BP du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

## CHAPITRE V

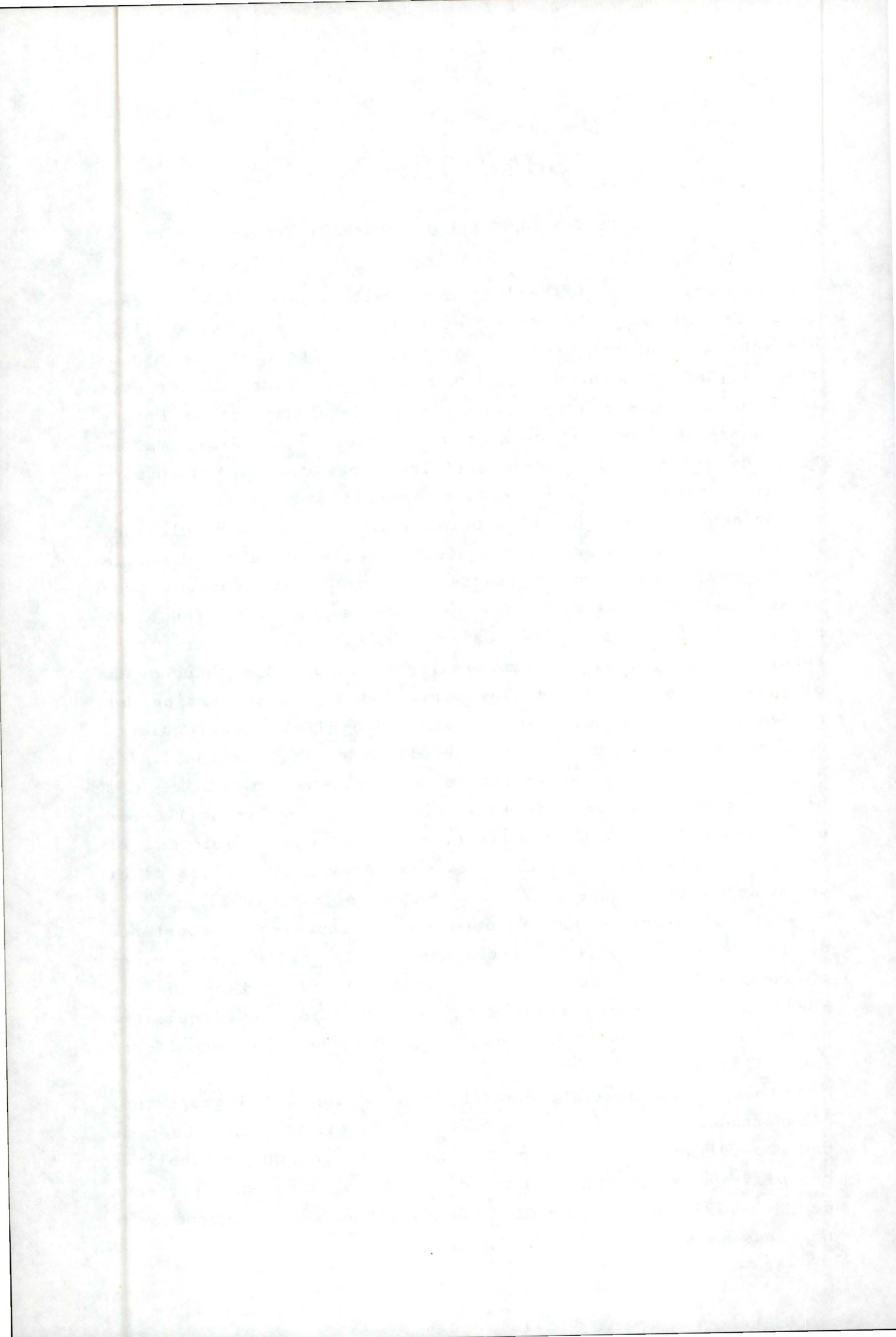
### DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

Le travail qui fait l'objet de cette étude s'inscrit dans le cadre général de l'étude des modifications du métabolisme énergétique concomitantes au maintien de l'homéostasie hydro-minérale. Dans ce contexte, le crabe *Eriocheir sinensis* se révèle être un modèle privilégié puisqu'il s'agit d'une espèce euryhaline qui est fréquemment confrontée à de larges variations de salinité du milieu extérieur lors de ces transhumances hivernales nécessaires à la reproduction du crustacé.

Les branchies jouent un rôle primordial dans l'osmorégulation, et plus spécifiquement six d'entre elles, situées dans la région postérieure de la cavité thoracique, qui adaptent progressivement leur structure en vue d'assurer cette fonction. Parallèlement aux modifications morphologiques et ultrastructurales de l'épithélium branchial, apparaissent des changements biochimiques et physiologiques parmi lesquels l'activation des pompes ioniques, principalement la  $(Na^+ - K^+)$  ATPase qui requiert, de surcroît, un surplus d'énergie [Gilles et Péqueux, 1985]. Afin de pourvoir à ces exigences, le métabolisme cellulaire des branchies postérieures est plus actif, ce qui se visualise par une dégradation accrue des réserves en glycogène [Welcomme et Devos, 1991], une consommation d'oxygène élevée [Dehnel, 1974] et une charge énergétique plus basse [Wanson et al., 1983].

Il est d'autre part intéressant de rappeler l'importance du Fru-2,6-bP dans le métabolisme de la cellule: cet ester bisphosphaté, activateur de la PFK-2 et inhibiteur de la FBPase-2, joue un rôle pivot dans la régulation de l'équilibre entre la glycolyse et la néoglucogenèse chez les mammifères [Hue et Rider, 1987].

Nous avons souligné, dans l'introduction bibliographique, l'importance des amines biogènes qui devraient contribuer de manière directe ou indirecte au contrôle du métabolisme cellulaire des crustacés lors d'un stress osmotique (Travaux de Zatta, 1987 et de Mantel & Sommer, 1988 sur le crabe vert *Carcinus maenas*).





Dans cette optique, nous avons été amené à nous intéresser au rôle de ces bioamines dans le transport ionique (par une mesure de la ddp) et de l'activité glycolytique (par une mesure de la concentration en Fru-2,6-bP) chez le crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à un milieu dilué.

D'une part, il est intéressant de mettre en évidence, dans les branchies antérieures comme dans les branchies postérieures, une activation du flux glycolytique par les bioamines: aussi bien la dopamine que la sérotonine augmentent la concentration intracellulaire branchiale en Fru-2,6-bP. Cet effet est identique à celui observé lorsque nous perfusions les BP et les BA avec du dibutyryl AMP cyclique. En présence de ce nucléotide cyclique, on mime l'effet d'une augmentation de la concentration d'AMP cyclique intracellulaire branchiale provoquée par l'action des amines biogènes (comme l'ont démontré Scheide et Dietz, en 1983, au cours de leurs travaux sur des moules d'eau douce).

Nous pensons que nos résultats sont en relation avec la présence de système(s) de phosphorylation/déphosphorylation induisant des phosphorylations de protéines provoquant une augmentation du Fru-2,6-bP et du flux glycolytique. Cet effet est en tout cas indépendant de la "capacité" transportrice de la branchie puisque une perfusion avec une solution "SW" donne les mêmes effets pour les deux types de branchies.

Pour soutenir son activité métabolique pendant la perfusion, la branchie puise sans aucun doute dans ses propres réserves énergétiques (glycogène?). Nous constatons d'ailleurs que les rapports ATP/ADP diminuent lors de ces perfusions et cela indépendamment de l'activité transportrice de ces branchies.

Au niveau du métabolisme énergétique, nos conditions expérimentales de perfusion ne nous permettent donc pas de mettre en évidence la contribution de la glycolyse dans le transport ionique: en effet, la perfusion amène une diminution de la concentration en Fru-2,6-bP et du rapport ATP/ADP aussi bien pour les BA que pour les BP du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce.

De plus, une "chute" du transport ionique, provoquée par la perfusion avec un Ringer "SW" ne modifie pas les effets obtenus

par les bioamines ou la perfusion lorsque celle-ci se déroule en "FW".

En tous les cas, la perfusion avec un substrat "glycolytique" limiterait sûrement la diminution du Fru-2,6-bP et celle du rapport ATP/ADP pendant les perfusions.

Il apparaît dès lors que, afin de limiter l'effet "métabolique" des bioamines pour mieux cerner leurs effets sur le transport ionique, la perfusion avec des "métabolites oxydables" s'impose. A ce propos, nous pensons que l'approche "énergétique" du transport ionique doit essentiellement tenir compte du métabolisme des acides aminés tels que l'alanine et la proline dont le rôle d'effecteur osmotique est bien connu [Gilles, 1979], et du métabolisme oxydatif du pyruvate via les mitochondries (voir à ce sujet Moyes, C.D et al., 1990)\*.

D'ailleurs, l'activité importante de la cytochrome c oxydase dans les branchies postérieures du crabe *Eriocheir sinensis* acclimaté à l'eau douce [Trausch, résultats non publiés] et la localisation stratégique des mitochondries près de la membrane baso-latérale des cellules épithéliales de ces mêmes branchies [Barra et al., 1983] plaident en faveur d'un lien étroit entre le système qui produit l'ATP (= la mitochondrie) et celui qui l'utilise (= la  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ).

Nos résultats ne vont pas contre l'idée que les bioamines agissent directement sur les "transporteurs ioniques". L'effet des bioamines sur la ddp transépithéliale s'explique si nous imaginons une activation de la  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) \text{ATPase}$  à la face séro-sale de l'épithélium des BA et des BP, quand cette enzyme est capable de transporter les ions  $\text{K}^+$  (milieu "FW"). Cet effet est d'ailleurs confirmé par le résultat qui montre que le flux entrant de  $\text{Na}^+$  peut être stimulé par la dopamine (du moins pour des BP perfusées avec du "FW").

L'effet hyperpolarisant obtenu dans les deux types de branchies peut être expliqué par une stimulation de cette enzyme. Pour les branchies postérieures, il faut aussi tenir compte du flux des ions  $\text{Cl}^-$  qui participeraient, plus que celui des ions  $\text{Na}^+$ , à la variation de la ddp (à confirmer).

Pour être complet, il est indispensable de poursuivre l'étude de l'effet des bioamines sur les flux ioniques du  $^{22}\text{Na}$  et du

$^{36}\text{Cl}$  en présence d'inhibiteurs spécifiques de pompes ou de canaux ioniques au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{Cl}^-$ , et d'envisager le rôle des acides aminés sur les diverses composantes "actives" du transport ionique.

Une étude qui isolerait des fractions subcellulaires à partir de crabes *Eriocheir sinensis* acclimatés à l'eau douce et à l'eau de mer, et enrichies en "transporteurs", permettrait une approche moléculaire du contrôle de l'activité de ce transport ionique ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{++}$ ) par les bioamines, et renforcerait l'idée selon laquelle ces neurohormones, via l'effet de l'AMP cyclique, moduleraient "à court terme" l'état de phosphorylation de protéines membranaires [Trausch et al., 1989].

Ces projets d'expériences permettront d'approfondir nos connaissances dans la physiologie et le métabolisme énergétique du crabe chinois *Eriocheir sinensis*, ainsi que dans l'adaptation de ces organismes à des milieux de salinité différente.

[\* référence: **MOYES, C.D., SUAREZ, R.K. and HOCHACHKA, P.W.** (1990)

"A comparison of fuel preferences of mitochondria from vertebrates and invertebrates"

Can. J. Zool., 68, 1337-1349]

# BIBLIOGRAPHIE

**ASSELBOURG, V.** (1989)

"La protéine kinase C et le transport ionique chez le crabe *Eriocheir sinensis* (H.Milne Edwards)"  
Mémoire de Licence en Sciences Zoologiques FUNDP Namur.

**ASSELBOURG, V., TRAUSCH, G., GILLES, R. and DEVOS, P.** (1991)

"Proteine kinase C and ion transport in the posterior gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*"  
Mar.Biol., 106 in press

**ATKINSON, D.E.** (1977)

"Cellular energy metabolism and its regulation"  
Academic Press. New-York.

**BARRA, J.A., PEQUEUX A., HUMBERT W.** (1983)

"A morphological study on gills on a crab acclimated to fresh water"

Tissue Cell, 15 : 583-596

**BATTELE, B.A. and KRAVITZ, E.A.** (1977)

"Targets of octopamine in the lobster: cyclic nucleotide changes and physiological effects in hemolymph, heart and exoskeletal muscle"

J.Pharm.Exp.Ther., 205, 435-448

**BAUCHAU, A.** (1966)

"La vie des crabes"  
Ed. Chevalier P., Paris

**BAUCHAU, A. and MENGEOT, J.C.** (1966)

"Sérotonine et glycémie chez les crustacés"  
Experimenta, 22, 238-239

**BERRIDGE, M.J.** (1985)

"Les molécules de la communication dans la cellule"  
Pour la science, 98, 134-146

**BIANCHINI, A. and GILLES, R.** (1989)

"cAMP as a modulator of NaCl transport in gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*"  
Mar.Biol., 104, 191-195

**BIELAWSKI, J.** (1971)

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

**BOSCA, L., MOJENA, M. and MARQUEZ C.** (1988)

"Phorbol 12,13-dibutyrate and mitogens increase fructose-2,6-bisphosphate in lymphocyte"  
Biochem.J., 175, 317-323

**BOULTON, P. and HUGGINS, K.A.** (1970)

"Glycolytic Activity in crustaceans"  
Comp.Biochem.Physiol., 33, 491-498

**BRUNI, P., VASTA, V. and FARNANARO, P.** (1989)

"An endpoint enzymatic assay for fructose-2,6-bisphosphate performed in 96-well plates"  
Analytical.Biochem., 178, 324-326

**CAMERON, J.N.** (1978)

"NaCl balance in blue crabs, *Callinectes sapidus*, in fresh water"

J.Comp.Physiol., 123, 127-135

**CLAUS, T.H., EL-MAGHREBI, M.R., REGEN, D.M., STEWART, H.B., PILKIS, J.**

*et al* (1984)

"The role of fructose-2,6-bosphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism"

Department of physiology, Vanderbilt University School of Medicine.

Curr.Top.Cell.Reg., 23, 57-86

**COMPERE, Ph., PEQUEUX, A., GOFFINET, G., GILLES, R.** (1985)

"Ultrastructure of the branchial epithelium of the Green crab, *Carcinus maenas*, as a function of the salinity of the environment"

Biol.Cell., 54, 7a

**CONTE, F.P., DROUKAS, P. and EWING, R.** (1977)

"Developpement of sodium regulation and *de novo* synthesis of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-activated ATPase in larval brine schrimp, *Artemia salina*"

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

**COOK, J.M. and SULLIVAN, R.E.** (1982)

"Hormones and neurosecretion"

In: Biology of crustacea, 3. Ed. by Bliss, D.E, Atwood, H.L. and Sandeman, D.C. Academic Press, New-York.

**COPELAND, D.E.** (1964)

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

Biol.Bull., 127, 367-368

**COPELAND, D.E.** (1968)

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

Amer.Zool., 8, 417-432

**COPELAND, D.E. and FITZJARREL, A.T.** (1968)

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

Z.Zellforsch., 93, 1-22

**CUGNON, L.** (1990)

"Phosphorylation de protéines de membranes associées aux transports d'ions dans les branchies du crabe Chinois"

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques, FUNDP Namur

**DEHNEL, P.A.** (1974)

"Gill tissue respiration in the crab *Eriocheir sinensis*"

Can.J.Zool., 52, 923-937

**EL-MAGHRABI, M.** (1982)

"Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependant phosphorylation"

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A Vol.79, 315-319

**EL-MAGHRABI, M.R., CLAUS, T.H., PILKIS, J., FOX, E. and PILKIS, S.J.** (1982a)

"Regulation of rat liver fructose-2,6-bisphosphate"  
J.Biol.Chem., 257, 7603-7607

**EL-MAGHRABI, M.R., PILKIS, J., FOX, E. and PILKIS, S.J.** (1982b)

"Cyclic AMP-dependant phosphorylation of rat liver 6-phospho-fructokinase/fructose-2,6-bisphosphatase"  
Biochem.Biophys.Res., 206, 794-802

**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

**ENGEL, D.W. and EGGERT, L.D.** (1974)

"The effect of salinity and sex on the respiration rates of excised gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*"  
Comp.Biochem.Physiol., 47A, 1005-1011

**ENGEL, D.W., FERGUSON, R.L. and EGGERT, L.D.** (1975)

"Respiration rates and ATP concentrations in the excised gills of the blue crab as a function of salinity"  
Comp.Biochem.Physiol., 52A, 669-673

**FRANCOIS, J., ERASO, P. and GANCEDO, C.** (1987)

"Changes in the concentration of cAMP, fructose-2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose"  
Biochem., 164, 369-373

**FRANCOIS, J., VAN SHAFTINGEN, E. and HERS, H.G.** (1984)

"Characterization of phosphofructokinase-2 and of enzymes involved in the degradation of fructose-2,6-bisphosphate in yeast"  
Eur.J.Biochem. 145, 187-193

**GILLES, R.** (1979)

"Mechanisms of osmoregulation in animals"  
Wiley-Intersciences, London New-York

**GILLES, R. and PEQUEUX, A.** (1985)

"Ion transport in crustacean gills: Physiological and Ultra-structural Approaches"  
In: Transport Processes, Iono- and osmoregulation. Ed. by R. Gilles and M. Gilles Baillien. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 136-158.

**GILLES, R., PEQUEUX, A. and BIANCHINI, A.** (1988)

"Physiological aspects of NaCl movements in the gills of the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*, acclimated to fresh water"  
Comp.Biochem.Physiol., Vol 90 A(1), 201-207

**GOCHA, N., PEQUEUX, A., WANSON, S., GILLES, R.** (1987)

"Cl<sup>-</sup> fluxes across isolated, perfused gills of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis* (M.Edw.)"  
Comp.Biochem.Physiol., 88 A, 581-584

**GOY, H.F., SCHWARTZ, T.L. and KRAVITZ, E.A.** (1984)

"Serotonin-induced protein phosphorylation in a lobster neuromuscular preparation"  
J.Neurosci., 4, 611-626

**HAMPP, R.** (1985)

"Luminometric methods"

In: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer, H.U. 3ième édition)  
Academic Press, New-York. Vol 7, 307-379

**HAYETTE, D.** (1990)

"Mécanisme d'action de la salinité sur le rythme respiratoire des branchies du crabe *Eriocheir sinensis* (H. Milne Edwards)"  
Mémoire de Licence, FUNDP-Namur.

**HERS, H.G. and VAN SCHAFTINGEN, E.** (1982)

"Fructose-2,6-bisphosphate two years after its discovery"  
Biochem. J., 206, 1-12

**HOFER, H.W.** (1985)

"Phosphorylation of phosphofructokinase - the possible role of covalent modification in the regulation of glycolysis"  
In: Regulation of carbohydrate metabolism, 1, ch. 5, Ed. by Beitner, R. CRC Press Floride.

**HOLLIDAY, C.W.** (1985)

"Salinity-induced changes in gills Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*"  
J. Exp. Biol., 233, 199-208

**HUE, L.** (1987)

"Le fructose-2,6-bisphosphate chez les mammifères"  
médecine/sciences, 3, 568-573

**HUE, L., BLACHNORES, P.F., SHIKAMA, H., ROBINSON-STEINER, A. and EXTON, J.H.** (1982)

"Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rats hepatocytes, perfused hearts and hindlimbs"  
J. Biol. Chem., 257(8), 4308-4313

**HUE, L. and RIDER, M.H.** (1987)

"Role of fructose-2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues"  
Biochem. J., 245, 313-324

**JAWORCK, D., GRUBER, W. and BERGMAYER, H.U.** (1974)

"Determination with 3-phosphoglycerate kinase"  
In: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer, H.U. eds) Academic Press, New-York. Vol. 4, 2097-2101

**KAHN, C.R.** (1975)

"Membrane receptors for hormones and neurotransmitters"  
J. Cell. Biol., 70, 261-288

**KAMEMOTO, F.I.** (1976)

"Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod crustacean"  
Am. Zool., 16, 141-150

**KAMEMOTO, F.I. and OYAMA, S.N.** (1985)

"Neuroendocrine influence on effector tissues of hydromineral balance in crustaceans"  
In: Ninth international symposium on comparative endocrinology. Proceedings (Lofts B. Ed.) Hong Kong University Press



**KELLER, R. and ANDREW, E.M (1973)**

"The sites of action of the crustacean hyperglycemic hormone"  
Gen.Comp.Endocr., 20, 572-578

**KELLER, R. and SELDMEIER, D. (1978)**

"Hyperglycemic hormones in crustaceans"  
In: Comparative Endocrinology Eds. Gaillard P.J., Boers H.H., 437-446.

**KELLER, R. and SELDMEIER, D. (1982)**

"The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. Involvement of cyclic nucleotides"  
Gen.Comp.Endocr., 45, 82-90

**KITAJIMA, S., SAKAKIBARA, R. and UYEDA, K. (1983)**

"Significance of phosphorylation of phosphofructokinase"  
J.Biol.Chem., 258, 13292-13298

**KITAMURA, K., KANGAWA, K., MATSUO, H. and UYEDA, K. (1988)**

"Phosphorylation of myocardial fructose-2,6-bisphosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase by cAMP-dependant protein kinase and protein kinase C"  
J.Biol.Chem., 263(32), 16796-16801

**KOCH, H.J., EVANS, J., SCHECKS, E. (1954)**

"The active absorption of ions by the isolated gills of the crab, *Eriocheir sinensis* (M.Edw.)"  
Meded.K.Vlaam Acad.Wet Kl.Wet., 16, 1-16

**KRETSCHMER, M et al (1987)**

"Fructose-2,6-bisphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase are separable in yeast"  
Biochem.J., 246, 755-759

**KROGH, A. (1938)**

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

**KUUCIJIMA, K. and 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-biP and fructose-6-P, 2-kinase"  
Biochem.Biophys.Res.Comm., 104(1), 84

**LARONDELLE, Y., MERTENS, E., VAN SHAFTINGEN, E. and HERS, H.G.**

(1989)

"Fructose-2,6-bisphosphate hydrolysing enzymes in Higher plants"  
Plant.Pysiol., 96, 827-834

**LEHNINGER, A.L. (1974)**

"Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires"  
Flammarion, médecine/sciences, 497-498

**LERAY, C.** (1984)

"Cellular energy metabolism and its regulation in gills of fish and crustacea"

In: Lecture notes on Coastal and Estuarine studies. 9. Ed by Péqueux, A., Gilles, R. et Bolis, L., Springer-verlag Berlin, Heildeberg, New-York, Tokyo, 28-34

**LORHMANN, D.H. and KAMEMOTO, F.I.** (1987)

"The effect of dibutyryl cAMP on sodium uptake by isolated, perfused gills of *Callinectes sapidus*"

Gen. Comp. Endocr., 25, 300-305

**MANTEL, L.H.** (1985)

"Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation"

Am. Zool., 25, 253-263

**MANTEL, L.H. and FARMER, L.L** (1983)

"Osmotic and ionic regulation"

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

**MANTEL, L.H. and LANDESMAN, J** (1977)

"Osmoregulation and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> activated ATPase in the Green crab, *Carcinus maenas* and in the spider crab *Libinia emarginata*"

Biol. Bull., 153, 437-438

**MANTEL, L.H. and SOMMER, M.J.** (1988)

"Effect of dopamine, cAMP and pericardical organs on sodium uptake and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in gills on the Green crab, *Carcinus maenas*"

J. Exp. Zool., 248, 272-277

**MELLOUKI, D.** (1990)

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

Mémoire de Licence en Sciences Zoologiques, FUNDP Namur.

**MERTENS, E., VAN SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G.** (1987)

"Fructose-2,6-bisphosphate and the control of the energy charge in Higher Plants"

Chimie Physiologie, 221(1), 124-128

**NEUFELD, G. J., HOLLIDAY, Ch. W., PRITCHARD, J. S.** (1980)

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

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

**PEQUEUX, A., BARRA, J. A.** (1980)

"Fine structure of the gill epithelium of the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*, as a function of the salinity of the acclimatation medium"

Eur. J. Cell. Biol., 22, 470

**PEQUEUX, A., BARRA, J. A., GOESSENS, G., WANSON, S., GILLES, R.** (1984)

"Fine structure of gill epithelium in three crabs, as related to their ionoregulation performances"

Abstract volume, First Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (lectures of 10B57, Liège-Belgium), p. B-135.

**PEQUEUX, A., CHAPELLE, S., WANSON, S., GOFFINET, G., FRANCOIS, C. (1983)**  
 "(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)ATPase activity and phospholipid content of various fractions of the posteriogills of *Carcinus maenas* and *Eriocheir sinensis*"

Mar.Biol.Lett., 4, 267-279

**PEQUEUX, A., GILLES, R. (1977)**

"Osmoregulation of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* as related to the activity of the (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase"

Arch.Internat.Physiol.Biochem., 85, 426-427

**PEQUEUX, A., GILLES, R. (1978a)**

"Osmoregulation of the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis*. Ionic transports across isolated perfused gills as related to the salinity of the environment."

In: "Physiology and Behaviour of Marine Organisms" (Mc Lusky, D.S., Berry, A.J., eds) Pergamon Press, Oxford, New-York., 105-111.

**PEQUEUX, A., GILLES, R. (1978b)**

"Na<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub> co-transport in isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to fresh water"

Experientia, 34, 1953-1954.

**PEQUEUX, A., GILLES, R. (1981)**

"Na<sup>+</sup> fluxes across isolated perfused gills of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*"

J.Exp.Biol., 92, 173-186.

**PEQUEUX, A. and GILLES, R. (1984)**

"Control of the extracellular fluid osmolality in crustaceans"

In: Lecture notes on Coastal and Estuarine studies, Vol.9 - Ed by Péqueux, A., Gilles, R. and Bolis, L., Springer-Verlag Berlin, Heildeberg, New-York, Tokyo.

**PEQUEUX, A. and GILLES, R. (1986)**

"Physiological and ultrastructural studies of NaCl transport in crustacean gills"

Bol.Zool., 53, 173-182.

**PEQUEUX, A., GILLES, R. (1988)**

"The transepithelial potential difference of isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to fresh water"

Comp.Biochem.Physiol., 89 A(2), 163-172

**PEQUEUX, A., GILLES, R. and MARSHALL, W.S. (1988)**

"NaCl transport in gills and related structures"

Adv.Comp.and Envir.Physiol., Vol.1 - Ed.by Greger, R.

**PEQUEUX, A. et LIGNON, J. (1988)**

"Approche écophysiological et ultrastructurale de l'osmorégulation chez les crustacés décapodes"

Dans: Aspects récents de la biologie des crustacés. Actes des Colloques-8-IFREMER, 137-148

**PROBST, I. and FECHNER, K. (1985)**

"Activation of glycolysis by insulin with a sequential increase of the 6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphate level and pyruvate kinase activity in cultured rat hepatocytes."

Eur.J.Biochem., 153, 347-353

- RAMAIAH, A.** (1974)  
 "Pasteur effect and phosphofructokinase"  
 Curr.Top.Cell.Regul., 8, 297-345
- REEVES, R.E.** (1976)  
 Trends.Biochem.Sci., 1, 53-55
- RENARD, C.** (1980)  
 "Influence de l'injection des bioamines sur la glycémie d'un crustacé décapode macroure *Homarus americanus* (H.Milne Edwards)"  
 Mémoire de Licence en Sciences Zoologiques, FUNDP Namur.
- SALE, E.M. and DENTON, R.M.** (1985)  
 "Adipose-tissue phosphofructokinase: rapid purification and regulation by phosphorylation in vitro"  
 Biochem.J., 232, 897-904
- SALE, E.M. and DENTON, R.M.** (1985)  
 "B-adrenergic agents increase the phosphorylation of phosphofructokinase in isolated rat epididymal white adipose tissue"  
 Biochem.J. 232, 905-910
- SALE, E.M., WHITE, M.F. and WAHN, R.** (1987)  
 "Phosphorylation of glycolytic and glucogenesis enzymes by insulin receptor kinase"  
 J.Cell.Biochem., 33, 15-26
- SAVAGE, J.P. and ROBINSON, G.D.** (1983)  
 "Inducement of increased gill (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase activity by a hemolymph factor in hyperregulating *Callinectes sapidus*"  
 Comp.Biochem.Physiol., 74A, 65-69
- SCHEIDE, J.I., DIETZ, T.H. and SAINTSING, D.G.** (1982)  
 "Monoamine transmitters and cAMP stimulation of Na transport in fresh water mussels"  
 Can.J.Zool., 60, 1408-1411
- SCHEIDE, J. and DIETZ, T.** (1983)  
 "Serotonin-stimulated adenylate cyclase in the gill of fresh water mussel and its relationship to sodium transport"  
 Physiol.Zool., 56(4), 585-596
- SCHEIDE, J. and DIETZ, T.** (1986)  
 "Serotonin-regulation of gill cAMP production, Na, and water uptake in fresh water mussels"  
 J.Exp.Zool., 240, 309-314
- SCHOFFENIELS, E. and GILLES, R.** (1970)  
 "Osmoregulation in aquatic arthropods"  
 In: M.Florkin and B.Scheer (eds). Chem.Zool., Vol.5. Academic Press, New-York, London, 255-286
- SIEBERS, D., LEWEEK, K., MARKUS, H., WINKLER, A.** (1982)  
 "Sodium regulation in the shore crab, *Carcinus maenas* as related to ambient salinity"  
 Mar.Biol.Lett., 69, 37-43
- SOMMER, M.J.** (1985)  
 "Effect of biogenic amines, cAMP and pericardial organs on osmoregulatory processes in the Green crab."  
 Thèse de doctorat

**SPENCER, A., FIELDING, A.H., KAMEMOTO, F. (1979)**

"The relationship between gill Na-K-ATPase activity and osmoregulatory capacity in various crabs"  
 Physiol.Zool., 52, 1-10

**SPINDLER, K., WILLIG, A. and KELLER, R. (1975)**

"Cyclic nucleotides and crustacean blood glucose levels"  
 Comp.Biochem.Physiol., 54B, 301-304

**STOREY, K.B. (1983)**

"Regulation of coackroach flight muscle phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate. Role in the activation of muscle metabolism during flight"  
 FEBS Lett., 162, 265-268

**STOREY, K.B. (1984)**

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

**STOREY, K.B. (1985)**

"Phosphofructokinase from flight muscle of the coackroach *Periplaneta americana*. Control of enzyme activation during flight"  
 Insect.Biochem., 15, 663-666

**STOREY, K.B. (1985b)**

"Fructose-2,6-bisphosphate and anaerobic metabolism in marine molluscs"

FEBS Lett., 182(2), 245-248

**STOREY, K.B. (1988)**

"Mechanisms of glycolytic control during facultative anaerobiosis in a marine mollusc tissue specific analysis of glycogen phosphorylase and fructose-2,6-bisphosphate"  
 Can.J.Zool., 66, 1767-1771

**THABREW, M.I., POAT, P.C. and MUNDAY, K.A. (1971)**

"Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue"  
 Comp.Biochem.Physiol., 40B, 531-541

**TOWLE, D.W., PALMER, G.E. and HARRIS, J.L. (1976)**

"Role of gill  $NA^+ - K^+$ -dependant ATPase acclimatation of blue crabs, *Callinectes sapidus*, to low salinity"  
 J.Exp.Zool., 196, 315-322

**TOWLE, D.W. (1981)**

"Role of  $NA^+ - K^+$  ATPase in ionic regulation by marine and estuarine animals"  
 Mar.Biol.Lett., 2, 107-122

**TOWLE, D.W. (1984a)**

"Regulatory functions of ( $NA^+ - K^+$ )-ATPase in marine and estuarine animals"

In: Lectures notes on coastal and estuarine studies, Vol.9. Ed by Gilles, R., Péqueux, A. et Bolis, L. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 157-170.

**TOWLE, D.W. and KAYS, W.T. (1986)**

"Basolateral localisation of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in gill epithelium of two osmoregulatory crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*"

J. Exp. Zool., 239, 314-318

**TRAUSCH, G. (1975)**

"Etude de l'activité glycolytique chez un crustacé, *Homarus vulgaris* Milne Edwards"

Thèse de doctorat en Sciences Chimiques.

**TRAUSCH, G., FORGET, M.Cl. and DEVOS, P. (1989)**

"Bioamines stimulated phosphorylation and  $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$  ATPase in the gills of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*"

Comp. Biochem. Physiol., Vol. 94B, 487-492

**UYEDA, K. (1979)**

"Phosphofructokinase"

Adv. Enz., 48, 193-244

**UYEDA, K., FURUYA, E., RICHARDS, C., YOKOAMA, M. (1982)**

"Fructose-2,6-P<sub>2</sub> chemistry and biological function"

Mol. Cell. Biochem., 48, 97-120

**VAN SCHAFTINGEN, E. (1984)**

"Methods of enzymatic analysis"

Edition Bergmeyer H. et al., verlag chimie, 7, 335-341 (3ième édition).

**VAN SCHAFTINGEN, E. (1985)**

"Fructose-2,6-bisphosphate"

Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur UCL

**VAN SCHAFTINGEN, E. (1986)**

"Fructose-2,6-bisphosphate"

Adv. Enz., 59, 315-335

**VAN SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1981)**

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 2861-2863

**VAN SCHAFTINGEN, E. and HERS, H.G. (1986)**

"Purification and properties of phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase from chicken liver and from pigeon muscle"

Eur. J. Biochem., 159, 359-369

**VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L. and HERS, H.G. (1980a)**

"Study of the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphatase in the liver *in vivo*"

Biochem. J., 192, 263-271

**VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L. and HERS, H.G. (1980b)**

"Control of the fructose-6-phosphate/fructose-1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase"

Biochem. J., 192, 887-895

**VAN SCHAFTINGEN, E., HUE, L. and HERS, H.G. (1980)**

"Fructose-2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase"

Biochem. J., 192, 897-901

- WALS, P.A., PALACIN, M. and WATZ, J. (1988)**  
"The zonation of liver and the distribution of fructose-2,6-bisphosphate in the rat liver"  
Biol.Chem., 265(10), 4876-4881
- WANSON, S., PEQUEUX, A., GILLES, R. (1983)**  
"Osmoregulation in the stone crab, *Cancer pagurus*"  
Mar.Biol.Lett., 4, 321-330
- WANSON, S., PEQUEUX, A., LERAY, C. (1983)**  
"Effect of salinity changes on adenylate energy charge in gills of two euryhaline crabs"  
Arch.Int.Physiol.Biochem., 91, 81-82
- WEISS, S. and DRUMMOND, G.I. (1981)**  
"Dopamine and serotonin-sensitive adenylate cyclase in the gill of *Aplysia californica*"  
Molec.Pharmacol., 20, 592-597
- WELCOMME, L. and DEVOS, P. (1988)**  
"Cytochrome c oxydase and  $Na^+ - K^+$ -ATPase activities in the anterior and posterior gills of the shore crab, *Carcinus maenas* after adaptation to various salinities"  
Comp.Biochem.Physiol., 89B, 339-341
- WELCOMME, L. and DEVOS, P. (1991)**  
"Energy consumption in the perfused gills of the euryhaline crab *Eriocheir sinensis* (H.Milne Edwards) adapted to freshwater"  
J.Exp.Zool., 257, 150-159
- ZATTA, P. (1987)**  
"Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic stress of *Carcinus maenas*"  
Mar.Biol.Lett., 96, 479-481