

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Étude d'organes sensibles à l'hormone hyperglycémiant chez le homard *Homarus Americanus* (H. Milne Edwards).**

**Identification des différents types de protéines phosphorylées suite à l'action de protéines kinases endogènes**

Benoit, Marie-Ange

*Award date:*  
1985

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

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

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

#### **Take down policy**

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



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

---

ETUDE D'ORGANES SENSIBLES A L'HORMONE HYPERGLYCEMIANTE  
CHEZ LE HOMARD HOMARUS AMERICANUS (H. MILNE EDWARDS).  
IDENTIFICATION DES DIFFERENTS TYPES DE PROTEINES  
PHOSPHORYLEES SUITE A L'ACTION DE PROTEINES KINASES  
ENDOGENES.

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

Marie-Ange BENOIT

1984 - 1985

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur P. Devos, promoteur de ce mémoire, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et qui, par son intérêt continuel, ses encouragements et ses judicieux conseils m'a guidée et beaucoup aidée tout au long de l'année.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur G. Trausch ainsi qu'à tous les membres du laboratoire pour leur assistance amicale et la sympathique ambiance qu'ils ont su créer toute cette année. Je pense particulièrement à S. Loret qui m'a apporté son aide pratique.

Enfin que mes parents et spécialement ma maman, trouvent ici l'expression sincère de ma reconnaissance pour leur aide et pour m'avoir offert la possibilité d'entreprendre ces études.

I. MATERIEL BIOLOGIQUE.	
I.1. Position systématique	1
I.2. Intérêts de l'étude des crustacés	1
a - Intérêt économique	1
b - Intérêt médical	1
c - Rôle écologique	2
I.3. Intérêts du homard	2
II. LES PROTEINES KINASES.	3
II.1. Définition	3
II.2. Découverte de la protéine kinase	4
II.3. Classification des protéines kinases	5
II.4. Caractéristiques des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique	5
1 - Localisation: subcellulaire	5
2 - Structure de ces molécules	6
3 - Découverte de deux types de protéines kinases A	6
4 - Protéines kinases de type A chez le homard <u>Homarus americanus</u>	7
II.5. Caractéristiques des protéines kinases stimulées par le GMP cyclique	8
1 - Structure de ces molécules	8
2 - Détermination de la masse moléculaire	9
3 - Protéines kinases G du homard <u>Homarus americanus</u>	9
II.6. Fonctions des protéines kinases	9
1 - Rôle de la protéine kinase A dans la glycogénolyse et la synthèse du glycogène dans le muscle de mammifère	9
2 - Rôle des protéines kinases A dans le métabolisme des acides gras	11
3 - Phosphorylations et protéines	12
II.7. La calmoduline et les protéines kinases A	13
II.8. Les effecteurs de kinases	16
1 - Le rôle des cations divalents	16
2 - Le rôle du pH	16
3 - Le rôle des nucléotides cycliques	16
4 - L'inhibiteur	17
4.1.1 - Découverte de l'inhibiteur	18
4.1.2 - Caractéristiques	18
4.1.3 - Mode d'action	19
4.1.4 - Conditions physiologiques affectant l'inhibiteur	20

4.2 - L'inhibiteur des kinases A et des phosphodiesterases	20
4.3 - L'inhibiteur de type 2	20
III. CORRELATION ENTRE PHOSPHORYLATION & FACTEURS HYPERGLYCEMIANTS	21
III.1. Le glucagon	21
III.2. Sérotonine et octopamine	22
IV. ETUDE DU OU DES FACTEUR(S) HYPERGLYCEMIANT(S) CHEZ LES CRUSTACES	23
IV.1. Découverte d'un facteur hyperglycémiant	23
IV.2. Les pédoncules oculaires: structure et neurosécrétions	23
a - Structure des P.O	23
b - Neurosécrétions	24
IV.3. Purification et identification de l'hormone hyperglycémiante	25
IV.4. Spécificité de l'hormone hyperglycémiante	26
IV.5. Mode d'action et organes-cibles de l'hormone hyperglycémiante	27
IV.6. Autres facteurs hyperglycémiants	29
<b>ORIENTATION DU TRAVAIL</b>	31
<b>MATERIEL &amp; METHODES</b>	
<u>A. -TECHNIQUES</u>	
I. PRELEVEMENT DES TISSUS	32
I.1. Prélèvement de l'hémolymphe	32
I.2. Prélèvement des organes	32
II. HOMOGENEISATION	
II.1. Homogénéisation dans le tampon Pipès	33
II.2. Homogénéisation dans le TCA	33
III.METHODE DE PHOSPHORYLATION "IN VITRO"	33
IV. CHROMATOGRAPHIE SUR TAMIS MOLECULAIRE	35
V. INJECTION DE <sup>32</sup> P "IN VIVO"	35
VI. PREPARATION & INJECTION D'UNE FRACTION HYPERGLYCEMIANTE (F.7) DE PEDONCULES OCULAIRES	36
VII.DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DANS LES ORGANES	37
VIII.ELECTROPHORESES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SDS	37

VIII.1. Préparation des gels	38
VIII.2. Préparation des plaques et coulage des gels	38
VIII.3. Electrophorèses et migration des protéines	39
VIII.4. Coloration des gels	40
VIII.5. Sèchage des gels	40
IX. AUTORADIOGRAPHIE	40
<u>B. - DOSAGES</u>	
I. DOSAGE DES PROTEINES	43
II. DOSAGE DU GLUCOSE DANS L'HEMOLYMPHE	43

## RESULTATS

### "IN VITRO"

I. VERIFICATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	45
I.1. Le système de référence	45
I.2. L'homogénat d'hépatopancréas de crabe	46
II. PHOSPHORYLATIONS DANS L'HEPATOPANCREAS DE HOMARD	47
II.1. Effet de l'EDTA	47
II.2. Effet de l'AMPc et de la concentration en ATP	48
III. PRESENCE D'UN INHIBITEUR DANS L'HOMOGENAT D'HEPATOPANCREAS DE HOMARD	49
III. 1. Stabilité du système de référence	49
III. 2. Inhibition des phosphorylation du système de référence par l'homogénat d'hépatopancréas de homard	50
III. 3. Essai d'isolement de l'inhibiteur par chromatographie sur tamis moléculaire	51
III.3.1 Calibrage de la colonne	51
III.3.2 Chromatographie d'un extrait d'hépatopancréas	51

### "IN VIVO"

1. ETUDE DES PHOSPHORYLATIONS CHEZ UN INDIVIDU NORMAL	54
1.1. Cinétique de disparition du $[^{32}\text{P}] \text{Na H}_2\text{PO}_4$	54
1.2 Evolution de la radioactivité dans l'eau de mer	55
1.3 Capture de la radioactivité dans les organes	56
1.4 Les protéines circulantes	56
1.5 Electrophorèse et autoradiographie	57

2.	ETUDE DES PHOSPHORYLATIONS CHEZ UN INDIVIDU EPEDONCULE INJECTE A LA FRACTION HYPERGLYCEMIANTE	58
2.1.	Evolution de la glycémie	58
2.2.	Cinétique de disparition du $[^{32}\text{P}]\text{Na H}_2\text{PO}_4$ dans l'hémolymphe	59
2.3.	Evolution de la radioactivité dans l'hémolymphe	60
2.4.	Radioactivité dans les organes	61
2.5.	Electrophorèse et autoradiographie	61
3.	ETUDE DES PHOSPHORYLATIONS CHEZ UN INDIVIDU NORMAL INJECTE DU FACTEUR HYPERGLYCEMIANT	62
3.1.	Evolution de la glycémie	63
3.2.	Cinétique de disparition de la radioactivité dans l'hémolymphe	63
3.3.	Evolution de la radioactivité dans l'eau de mer	64
3.4.	Capture de la radioactivité et incorporation dans les protéines	65
3.5.	Electrophorèse et autoradiographie	65

## DISCUSSION

-	DISCUSSION DES EXPERIENCES "IN VITRO"	66
-	DISCUSSION DES EXPERIENCES "IN VIVO"	70

## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

LISTE DES ABREVIATIONS & SYMBOLES.

Ci	curie
°C	température (degré centigrade)
cpm	coups par minute
DEAE cellulose	diethylaminoéthyl cellulose
g	gramme
M	molaire
mCi	millicurie
ml	millilitre
mM	millimolaire
nm	nanomètre
PM	poids moléculaire
PO	pédoncules oculaires
pmole	picomole
rpm	rotation par minute
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire

INTRODUCTION .

MATERIEL BIOLOGIQUE .

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .

ORIENTATION DU TRAVAIL .

## I. MATERIEL BIOLOGIQUE.

### I.1. Position systématique.

L'animal sur lequel porte notre étude fait partie de l'embranchement des arthropodes. Le homard appartient à la classe des crustacés. Il s'agit plus précisément d'un crustacé décapode macroure.

L'espèce choisie est Homarus americanus (H. MILNE EDWARDS) d'origine canadienne. L'espèce américaine est en effet plus résistante pendant les mois d'hiver que celle que l'on rencontre sur nos côtes: Homarus vulgaris.

### I.2. Intérêts de l'étude des crustacés.

L'étude des crustacés est intéressante à différents points de vue, notamment, économique, médical et écologique.

#### a. Intérêt économique.

Sur les côtes de nombreux pays, le commerce des crustacés s'est fortement développé; ainsi, en Belgique, la pêche à la crevette a acquis une certaine importance. Il en est de même au Groenland. D'autre part, beaucoup de pays, face aux risques d'extinction de diverses espèces, ont entrepris un élevage intensif. Citons par exemple, le Japon, la France, qui développent celui de la crevette, du homard, des crabes et de l'écrevisse.

#### b. Intérêt médical.

Après de nombreuses études sur la biochimie de la chitine, les japonais ont découvert le chitosan, employé pour ses qualités de résorption dans les interventions chirurgicales.

Par ailleurs, certains crustacés sont vecteurs de maladies.

Ainsi, en Afrique, pendant la saison sèche, les simules pondent leurs oeufs au niveau des pattes de crabes. Cette stratégie assure aux larves une humidité suffisante pour survivre. Malheureusement, ces simulies véhiculent une filaire: Onchocerca volvulus qui est transmise à l'homme par piqure. Les individus atteints perdent progressivement la vue et finalement deviennent aveugles.

### c. Rôle écologique.

1. Les crustacés constituent un maillon important dans la chaîne alimentaire; ce qui représente un stock important de protéines disponibles. Ce phénomène est observé en milieu marin et en eau douce où ils servent de nourriture aux prédateurs supérieurs, quel que soit leur stade de développement. En Ardennes, par exemple, la daphnie et le gammaré constituent la nourriture de choix des truites. La plantation de résineux, responsables de l'acidification de l'eau et donc, empêchant la formation d'exosquelette chez les crustacés, a conduit à une nette diminution de la population des truites dans nos cours d'eau. Dans l'Antarctique, la disparition du Krill (crevette primitive) a amené une rupture dans la chaîne alimentaire qui se répercute finalement sur les cétacés ainsi menacés d'extinction.
2. Ils constituent des indicateurs de pollution organique locale. En effet, dans ce cas, les bactéries se multiplient rapidement; étant source de nourriture des ciliés et des rotifères, ces derniers augmentent également et induisent donc une augmentation de la population des crustacés amphipodes (gammarés, cyclopes, daphnies).

### I.3. Intérêts du homard.

L'avantage de cet animal se situe à différents niveaux:

- il est assez grand, ce qui facilite sa manipulation et permet d'isoler suffisamment de matériel pour l'expérimentation.

Dans le cadre de notre étude, les animaux testés pesaient plus ou moins 450 gr. Ainsi, le coeur, le plus petit organe utilisé, a un poids moyen de 0,3 à 0,5 gr.

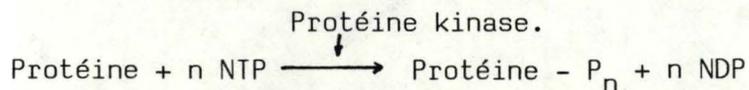
Le stockage en laboratoire est relativement aisé, bien que l'animal soit marin. Les individus sont placés dès leur arrivée, dans des bacs d'eau de mer continuellement oxygénée et dont la température est maintenue entre 8°C et 10°C. Leur source de nourriture est exclusivement la moule. Toutefois, deux jours avant l'expérience, les animaux sont mis à jeun de manière à uniformiser les conditions expérimentales.

Vu sa position phylogénétique parmi les invertébrés les plus évolués tant au point de vue organisation que comportemental, il constitue également un matériel de choix pour les études de biochimie et de physiologie comparées.

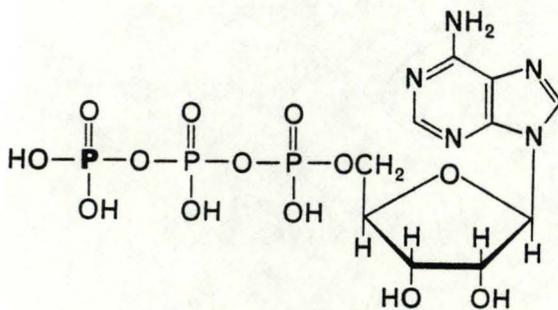
## II. Les protéines kinases.

### II. I. Définition.

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate terminal provenant d'un nucléotide cyclique sur une protéine. Ceci peut se résumer de la façon suivante:



Généralement, le groupe donneur de phosphate symbolisé ci-dessus par "NTP" est l'ATP (adénosine 5' - triphosphate).



Structure de l'ATP.

Cependant, dans certains cas, l'ATP peut être remplacé par un autre nucléotide cyclique: le GTP (guanosine 5' - triphosphate).

L'accrochage du groupe phosphate sur la protéine se fait préférentiellement sur certains acides aminés tels que la sérine, la thréonine et plus rarement sur l'histidine ou la lysine.

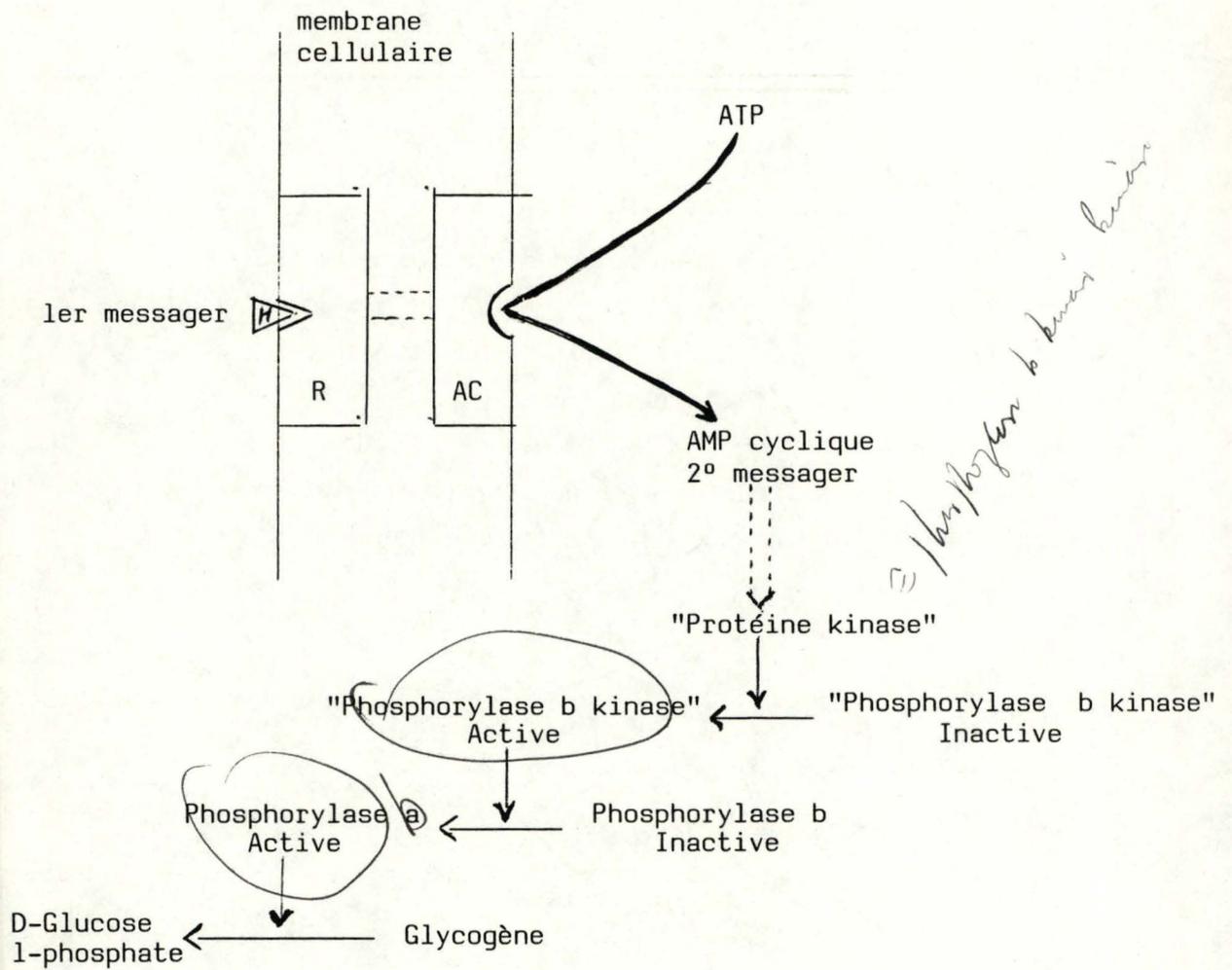
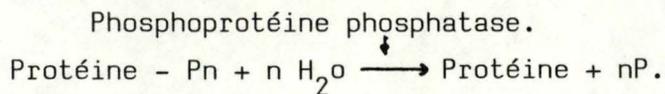


Figure II.1

Contrôle hormonal de l'activité de la phosphorylase du glycogène au niveau du foie de mammifère.

H : hormone : adrénaline ou glucagon  
 R : récepteur de l'hormone  
 AC: cyclase de l'adénylate

Cette réaction de "phosphorylation" est réversible; la libération d'un groupe phosphate à partir d'une "protéine-porteuse" appelée phosphoprotéine, se fait grâce à l'action d'une phosphatase:



## II. 2. Découverte de la protéine kinase

Vers la fin des années 40, Sutherland et son équipe ont étudié la stimulation hormonale, par l'adrénaline et le glucagon, de la dégradation du glycogène hépatique. Ces travaux ont conduit à la découverte de l'adénylate cyclase, à l'identification et à l'isolement du produit formé, l'AMP cyclique (Rall & al., 1957).

L'hypothèse du second messenger a alors été émise par Sutherland: l'information originale véhiculée par l'hormone, ce qu'on pourrait appeler premier messenger, est reconnue au niveau de la membrane via un récepteur spécialisé. La formation d'un complexe hormone-récepteur détermine l'activation d'une protéine membranaire, l'adénylate cyclase. Celle-ci induit la formation, à partir d'ATP, d'AMP cyclique qui serait le second messenger et qui pourrait contrôler une séquence de réactions métaboliques intracellulaires aboutissant finalement à une réponse caractéristique à l'hormone.

Mais comment agit l'AMP cyclique?

On savait notamment, que la phosphorylase du glycogène du foie existait sous deux formes: l'une active et l'autre inactive (Green & Cori, 1943; Cori & cori, 1945). Sutherland & Rall (1958) ont montré que la forme inactive est activée en présence d'AMP cyclique. Cette activation implique une réaction de phosphorylation catalysée par une kinase de la phosphorylase, active en présence d'AMP cyclique. La kinase de la phosphorylase est elle-même activée par un mécanisme similaire, (Krebs & al., 1959).

Krebs & al. (1964) ont étudié l'effet de l'AMP cyclique via une autre kinase qu'ils ont appelée "phosphorylase b kinase kinase". L'existence de cet enzyme fut confirmée par Walsh & al (1968). Depuis, il a été démontré que cet enzyme est capable de catalyser la phosphorylation d'un grand nombre de protéines autres que la kinase de la phosphorylase b et on l'a donc rebaptisé "protéine kinase".

### II. 3. Classification des protéines kinases.

Il existe différents types de protéines kinases, mais actuellement un système de classification unanimement admis, n'a pas encore été défini. Au départ, la kinase était spécifiée par le nom de la protéine sur laquelle elle exerçait son activité; ainsi par exemple l'histone kinase, ou encore la caséine kinase, la protamine kinase, etc ...

Par la suite, on s'est aperçu qu'une grande majorité d'entre elles pouvait catalyser la phosphorylation de plusieurs substrats; ce système, source de nombreuses confusions, a été abandonné, mis à part quelques exceptions où la kinase est absolument spécifique de la protéine comme l'opsine kinase qui catalyse la phosphorylation de la rhodopsine rétinienne.

Il est actuellement bien établi que le contact entre les kinases et l'extérieur de la cellule est assuré par des messagers tels l'AMP cyclique et le Ca<sup>++</sup>.

Ces différents intermédiaires servent habituellement de critère pour la classification des protéines kinases.

On distingue habituellement:

- Les protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique ou protéine kinase A.
- Les protéines kinases dépendantes du GMP cyclique ou protéine kinase G.
- Les protéines kinases dépendantes du Ca<sup>++</sup>.
- Tout récemment on a mis en évidence des protéines kinases dépendantes de doubles brins de RNA.

Il existe aussi des protéines kinases indépendantes de tout messenger.

### II. 4. Caractéristiques des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique.

#### 1. Localisation subcellulaire.

Généralement, l'activité de la protéine kinase se mesure dans la fraction soluble de la cellule. Néanmoins, une activité très faible peut être reliée à certains organites subcellulaires, tels que, le noyau, les mitochondries et les ribosomes.

Dans le foie du rat, l'AMP cyclique peut provoquer des migrations de protéines kinases cytoplasmiques vers le noyau.

Ce phénomène n'est pas étonnant en soi, quand on sait que l'AMP cyclique est capable de stimuler la phosphorylation des histones (Castagna & al., 1975).

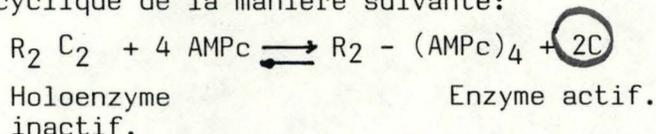
Dans l'état des connaissances actuelles, il est difficile d'estimer si oui ou non l'activité des kinases doit être reliée à des structures subcellulaires.

## 2. Structure de ces molécules.

Toutes les protéines kinases étudiées jusqu'à présent, sont formées de sous-unités: une sous-unité catalytique (C) et une sous-unité régulatrice (R).

L'holoenzyme est un tétramère constitué de deux unités C et deux unités R, de structure  $R_2C_2$ . L'enzyme sous forme native, qui est la forme inactive, a une masse moléculaire de 180.000 daltons. La masse moléculaire des sous-unités catalytiques varie de 30.000 à 50.000 daltons; quant à celle des sous-unités régulatrices, elle s'étale de 80.000 à 110.000 daltons.

La kinase n'est active que sous forme dissociée, c'est-à-dire, lorsque les sous-unités C sont libres. La libération de celles-ci se fait en présence d'AMP cyclique de la manière suivante:



Ce modèle a été identifié par deux groupes de chercheurs: l'équipe de Broström (1970) et celle de Gill (1970).

Il est sans doute trop tôt pour affirmer que la dissociation des unités R et C est le seul mécanisme d'activation des protéines kinases, mais aucun autre système n'a encore été proposé.

On connaît peu d'éléments sur les mécanismes d'interaction des unités R et C, mais des groupements SH seraient impliqués. En effet, Murray, (1974) a montré que le p-chloromercuribenzoate peut provoquer la dissociation de l'enzyme.

Par ailleurs, il semble que la sous-unité R masque le site actif de l'unité C.

## 3. Découverte de deux types de "protéine kinase" A.

En 1968, Walsh & al, ont identifié la première protéine kinase A et l'ont décrite comme un enzyme multifonctionnel. Par la suite de nombreuses formes de cet enzyme ont été signalées.

Actuellement, il est clairement établi que de nombreux tissus de mammifères possèdent deux types de kinases A, séparables par chromatographie sur DEAE - cellulose. Ces deux formes sont respectivement désignées comme des types I et II. La concentration relative de ces deux types varie selon les tissus, l'espèce animale étudiée et parfois même, selon le type cellulaire. Corbin & al (1975) ont montré que ces deux isoenzymes se différencient par la nature des sous-unités R. Elles ont même des poids moléculaires différents. Fleischer & al (1976) ont montré qu'elles sont immunologiquement distinctes car les anticorps dirigés contre l'un des deux types ne réagissent pas avec l'autre.

La protéine kinase A de type I se distingue de celle de type II par une affinité différente de l'AMP cyclique.

① En fait, le type I lie le Mg-ATP de façon non covalente et avec une très haute affinité, ce qui augmente son  $K_a$  pour l'AMP cyclique. Le type ② II ne possède pas de site de fixation pour le Mg-ATP, mais est phosphorylé en présence de faibles concentrations en Mg-ATP dans une réaction d'auto-phosphorylation. Au cours de celle-ci, une molécule de phosphate est transférée depuis l'ATP sur un résidu sérine de chaque sous-unité R. Les sous-unités catalytiques ne subissent pas d'autophosphorylation.

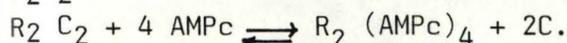
X Généralement, on admet que cette autophosphorylation augmente l'affinité de l'enzyme pour l'AMPc et/ou facilite la dissociation de la protéine kinase.

Ceci constituerait donc un mécanisme d'activation.

Les sous-unités catalytiques des deux types de kinases A (I & II) sont très semblables tant au point de vue masse moléculaire qu'au niveau de leurs propriétés cinétiques. Remarquons toutefois certaines différences telles que leur point isoélectrique. L'hétérogénéité relative des protéines kinases A est mal comprise. Les formes I & II interviennent vraisemblablement à des étapes différentes au sein des chaînes métaboliques "in vivo".

#### 4. Protéines kinases de type A chez le homard Homarus americanus.

Par chromatographie sur tamis moléculaire, Willemet (1981) a pu mettre en évidence une similitude entre les kinases A des vertébrés et celles du homard. Elles seraient également constituées de deux types de sous-unités: R & C. L'holoenzyme aurait également une structure de tétramère  $R_2C_2$ , de masse moléculaire de 169.000 daltons.



93x2  
38x2

$$\begin{array}{r} 106 \\ \times 6 \\ \hline 262 \end{array}$$

169

Quelques expériences réalisées dans notre laboratoire estiment la masse moléculaire des sous-unités catalytiques proche de 38.000 alors que les régulatrices dans leur configuration  $R_2$  (AMPC)<sub>4</sub> se situeraient aux alentours de 93.000 daltons.

L'hépatopancréas possède en majorité des kinases type A. Le muscle abdominal quant à lui, contient en nette majorité des kinases G. Le coeur et les branchies sont constituées plutôt d'un mélange des deux.

## II. 5. Caractéristiques des protéines kinases stimulées par le GMP cyclique.

C'est Kuo & Greengard (1969,a) qui les premiers ont proposé par analogie aux protéines kinases contrôlées par l'AMPC, l'existence de protéines kinases G dont les effets biologiques seraient contrôlés par le GMPc. La première Kinase G a été identifiée par ces auteurs en 1970 au niveau du muscle abdominal du homard.

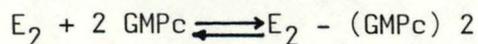
### 1. Structure de ces molécules.

Les premières études réalisées sur des enzymes partiellement purifiées à partir de muscle de homard ou de pancréas de rat, indiquaient que les protéines kinases G sont également constituées de sous-unités R & C. possédant une structure analogue aux A (Miyamoto & al, 1973). Cependant, ces résultats furent mis en doute suite à des découvertes plus récentes.

Ainsi, Gill & al (1976-1977) qui ont purifié jusqu'à l'homogénéité une protéine kinase G, à partir du poumon de boeuf, montrent que l'holoenzyme est en fait composé de deux sous-unités identiques, chacune pouvant à la fois fixer le GMP cyclique et exercer une activité catalytique.

De plus, suite à la fixation du GMPc, l'activation de l'enzyme a lieu sans dissociation.

Nous pouvons schématiser la réaction comme suit, où E représente une des deux sous-unités identiques:



## 2. Détermination de la masse moléculaire.

Des protéines kinases G hautement purifiées ont été préparées à partir du poumon de boeuf ( Gill & al. 1977; Lincoln & al. 1977 b) et du ver à soie (Takai & al. 1976). L'enzyme du poumon de boeuf a une masse moléculaire située entre 150.000 et 165.000 daltons et est composée de deux sous-unités identiques de masse moléculaire située entre 74.000 et 81.000 daltons. Après traitement à la trypsine d'une sous-unité, on peut obtenir un fragment catalytique ; ce qui indique qu'il existe deux sites fonctionnels distincts.

## 3. Protéine kinase G du homard Homarus americanus.

Il existe , au niveau du muscle de l'abdomen du homard une protéine kinase qui fixe le GMPc et dont la masse moléculaire se situerait aux environs de 158.000 daltons

Toutefois, le muscle contient également un récepteur intracellulaire du GMPc qui n'est pas une protéine kinase. ( Willemet, 1981)

## II. 6. Fonctions des protéines kinases.

La phosphorylation de protéines joue un rôle important dans la synchronisation de différentes voies métaboliques. Le rôle des protéines kinases est d'accrocher un groupe phosphate provenant d'une nucléotide, sur une protéine.

De manière tout à fait générale, les enzymes impliqués dans des voies cataboliques sont activés par phosphorylations, tandis que les enzymes impliqués dans des voies anaboliques sont inactivés par phosphorylations. Ce système assure donc une coordination dans les fonctions cellulaires puisqu'il permet la régulation de plusieurs voies métaboliques par les mêmes "protéines kinases" et "protéines phosphatases".

### 1. Rôle de la protéine kinase A dans la glycogénolyse et la synthèse du glycogène dans le muscle des mammifères.

Le système de régulation par phosphorylation a été étudié dans le cadre des modifications induites par l'action de l'adrénaline au niveau du muscle de mammifère.

Calc: 4/1 (P)  
am: 1/1 (P)

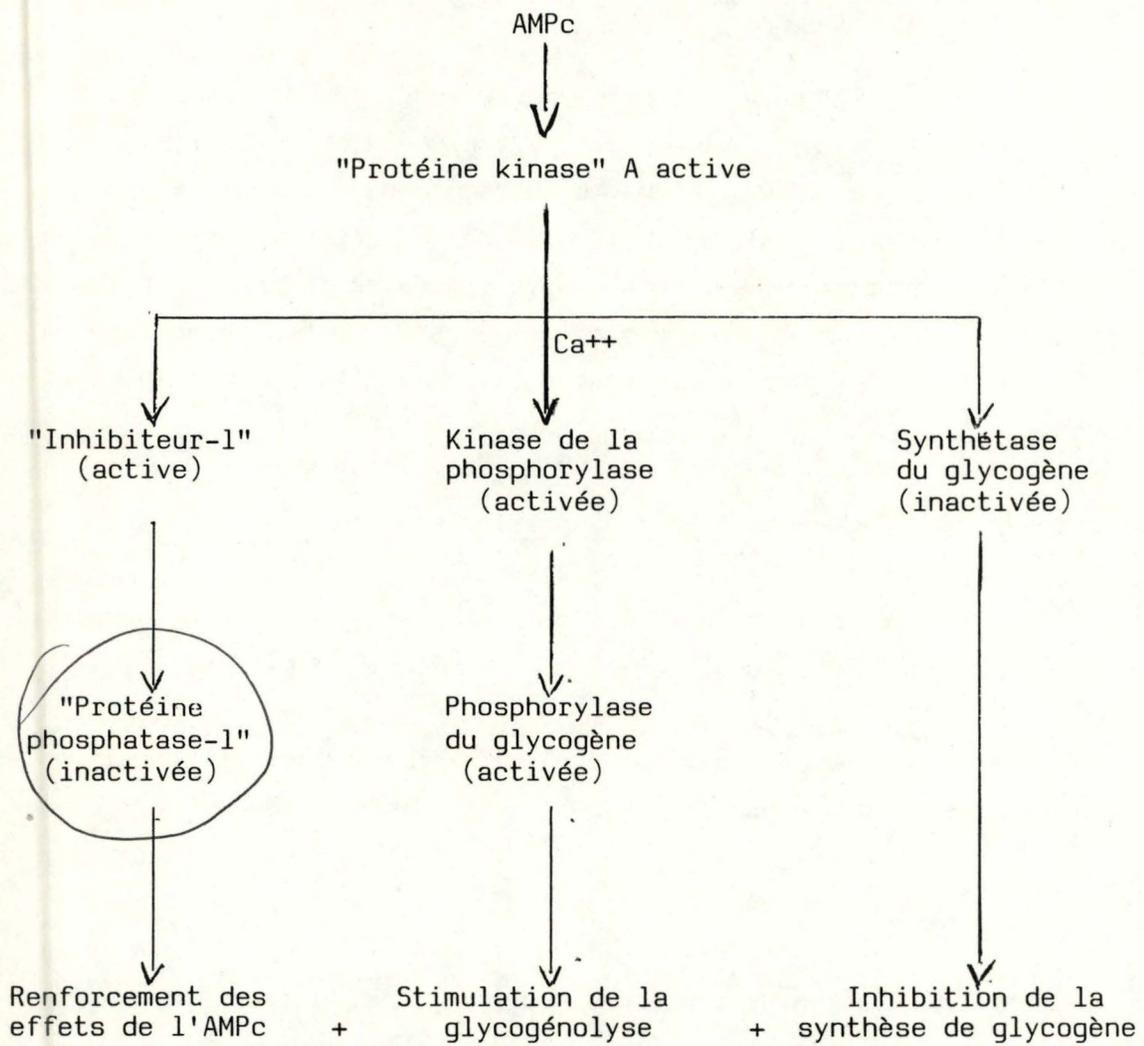


Figure II.6.1 Rôle de la "protéine kinase" A dans la glycogénolyse et le synthèse du glycogène.

La réponse hormonale se fait via une cascade de réactions reprises à la figure II.1 et aboutit finalement à la libération de glucose dans le sang. La première étape est caractérisée par l'interaction de l'adrénaline avec un récepteur membranaire externe induisant une activation de l'adénylate cyclase située sur la face interne de la membrane. Cette dernière enzyme catalyse la transformation de l'ATP en AMP cyclique.

L'AMP cyclique intracellulaire, deuxième messager, peut alors activer les kinases A en libérant leurs sous-unités catalytiques. Les sous-unités C de la protéine kinase A contrôlent le métabolisme du glycogène en phosphorylant trois protéines différentes:

- la kinase de la phosphorylase - la glycogène synthase - une protéine appelée inhibiteur 1.

La phosphorylation de la phosphorylase kinase induit une activation de cette enzyme, ce qui permet la transformation de la phosphorylase b (inactive) en phosphorylase a (active). Cette dernière induit la glycogénolyse

Quant à la phosphorylation de la synthase, elle produit une diminution de son activité enzymatique et donc, bloque la voie de biosynthèse du glycogène. Dès lors, des voies catalytiques opposées comme la glycogéno-poïèse et la glycogénolyse sont contrôlées de manière synchrone par un seul mécanisme. Suivant Cohen, la phosphorylase a, la kinase de la phosphorylase ainsi que la glycogène synthase peuvent être déphosphorylées par un enzyme unique: c'est la protéine phosphatase -1. A elle seule, cette enzyme peut assurer l'ensemble des déphosphorylations qui inhibent la glycogénolyse ou activent la synthèse du glycogène. L'activité de cet enzyme phosphatase-1 est modulée par "l'inhibiteur -1". Cette molécule est capable, une fois phosphorylée d'inactiver la protéine phosphatase -1.

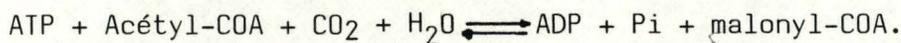
Dès lors, la phosphorylation par une protéine kinase A bloque la protéine phosphatase -1 et la glycogène synthase. Inversément, elle stimule la kinase de la phosphorylase. Finalement, la phosphorylation de ces trois molécules induit la glycogénolyse.

## 2. Rôle des protéines kinase A dans le métabolisme des acides gras.

Bien qu'ils n'existent qu'en faible quantité à l'état libre dans la cellule, les acides gras sont des molécules importantes. Ou bien ils se lient aux esters du glycérol pour former des triacylglycols ou triglycérides et sous cette forme, ils servent de réserve d'énergie pour la cellule; ou bien ils sont incorporés dans les phospholipides qui sont les constituants majeurs des membranes cellulaires.

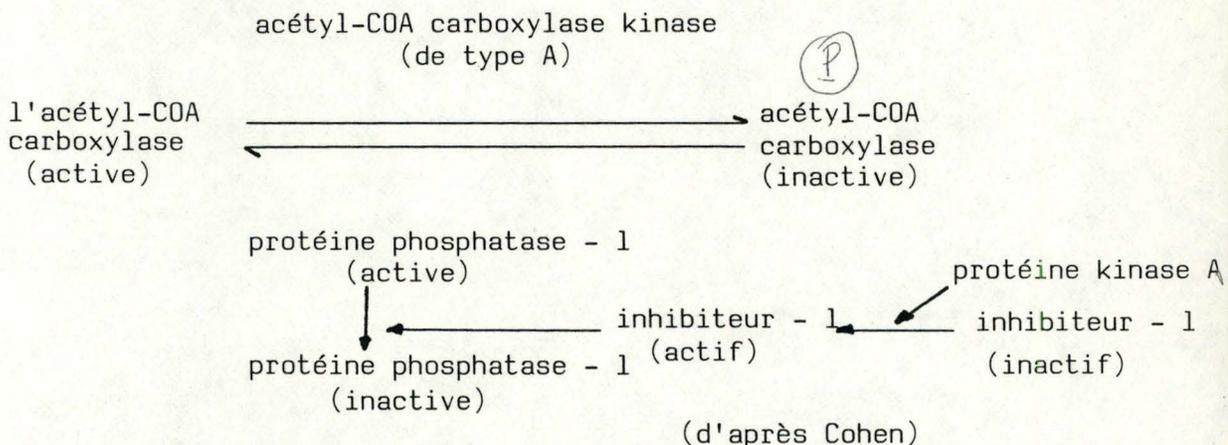
La synthèse des acides gras fait intervenir deux enzymes importants: l'acétyl-CoA carboxylase et la synthase constituée en fait d'un groupe de six enzymes.

Elle peut être affectée par des facteurs alimentaires mais également par certaines hormones qui modifient l'état de phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase. Cet enzyme catalyse la réaction suivante:



Lorsque le malonyl-CoA est formé, les étapes ultérieures de la synthèse se réaliseront dans une séquence de six étapes catalysées par les six enzymes constituant le système "acides gras synthétase".

L'acétyl-CoA carboxylase possède des caractéristiques cinétiques différentes selon son état de phosphorylation.



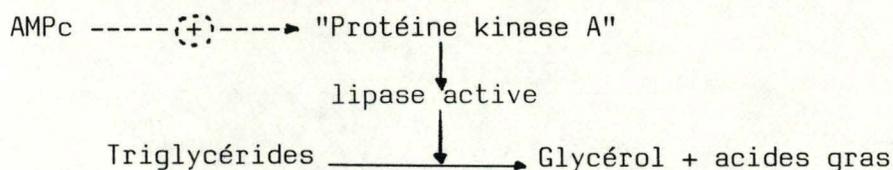
Deux protéines kinases au moins interviennent à des sites distincts de phosphorylation; ce sont - une protéine kinase A.

- l'acétyl-CoA carboxylase kinase dont le mécanisme de régulation est inconnu.

La réaction de déphosphorylation est catalysée par la protéine phosphatase - 1, elle-même activée par l'inhibiteur - 1, fonctionnel après phosphorylation.

On retrouve là, un parallélisme avec le système de régulation de la synthèse du glycogène.

La lipolyse est également contrôlée par des mécanismes de phosphorylation - déphosphorylation. En effet, la lipase qui catalyse la transformation des triglycérides en glycérol et acides gras libres n'est active qu'après phosphorylation par une kinase dépendante de l'AMPc.



### 3. Phosphorylation et protéines.

#### a. Phosphorylation de protéines membranaires.

Des protéines kinases A et des protéines acceptant des groupements phosphates font partie de certains organites subcellulaires dont les membranes plasmiques, le réticulum sarcoplasmique et les vésicules de sécrétion.

De nombreuses observations suggèrent que la phosphorylation de certaines protéines membranaires est liée à des modifications fonctionnelles spécifiques des structures subcellulaires.

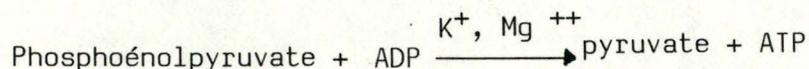
De cette manière on a relié phosphorylation et transport à travers les membranes, phosphorylation et sécrétion, et il existerait même une relation entre ce mécanisme et la perméabilité.

#### b. Contrôle de l'activité enzymatique.

Les protéines kinases A peuvent contrôler l'activité de nombreux enzymes tels que:

- la pyruvate kinase
- l'estérase du cholestérol
- l'anhydrase carbonique

La pyruvate kinase catalyse la réaction suivante:



La pyruvate kinase purifiée du foie de rat peut être phosphorylée dans une réaction stimulée par l'AMP cyclique et catalysée par une protéine kinase A.

L'enzyme est inactivé par phosphorylation.

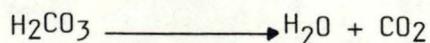
On sait que l'AMP cyclique active la gluconéogénèse dans le foie et l'inhibition de la pyruvate kinase. L'inactivation d'un enzymez clef contrôlant une étape irréversible de la glycolyse, prend donc tout son sens.

L'estérase du cholestérol intervient dans la réaction suivante:



Il est connu que les agents qui augmentent la concentration en AMP cyclique des glandes surrénales provoquent une diminution du taux d'esters du cholestérol suite à l'activation de l'estérase du cholestérol.

Pittman & al. (1975) ont montré que l'estérase du cholestérol purifiée peut être phosphorylée par une protéine kinase A obtenue à partir de glandes surrénales. Cette réaction s'insère dans la cadre plus large de la synthèse des stéroïdes à partir du cholestérol. L'anhydrase carbonique intervient dans la réaction suivante:



Elle peut être séparée, par chromatographie sur DEAE-cellulose, en deux isoenzymes dont l'un est susceptible d'être phosphorylé et activé par une protéine kinase A. Cette réaction est stimulée par l'AMP cyclique. A ce propos il est intéressant de signaler que les agents qui stimulent la sécrétion gastrique, augmentent la concentration en AMP cyclique dans la muqueuse gastrique, et ainsi, l'activité de l'anhydrase carbonique.

## II. 7. La calmoduline et les protéines kinases A.

L'importance des ions  $\text{Ca}^{++}$  dans la régulation cellulaire est établie depuis longtemps, mais la notion d'un récepteur intracellulaire qui contrôle l'activité de cet ion, d'une manière analogue à la sous-unité R de la "protéine kinase A" n'a été introduite que très récemment.

La découverte et l'identification de la calmoduline (Wolff & Broström, 1979) et ses nombreux effets ont renforcé cette idée. De nombreux éléments suggèrent qu'il pourrait être un récepteur universel des ions  $Ca^{++}$

Chaque molécule peut fixer jusqu'à quatre ions  $Ca^{++}$  et les complexes calmoduline -  $Ca^{++}$  peuvent ensuite se fixer sur un grand nombre de protéines et contrôler leur fonction. La calmoduline peut présenter plusieurs conformations, selon le nombre de  $Ca^{++}$  qui y sont fixés; en théorie, seize conformations existent, et chacune peut être reconnue par une protéine, ou un groupe de protéines différent. La calmoduline est largement distribuée, si pas omniprésente, chez les eucaryotes et toutes les formes examinées sont pratiquement identiques.

Ceci suggère que les quatre sites de fixation du  $Ca^{++}$  et d'autres éléments structuraux sont utilisés pour l'une ou l'autre des fonctions de la protéine.

On peut concevoir que différentes classes de protéines interagissent avec la calmoduline en fonction du degré d'occupation par le  $Ca^{++}$ .

Ainsi, la calmoduline pourrait traduire une différence quantitative dans la concentration en  $Ca^{++}$  en une réponse cellulaire qualitativement différente.

La régulation de l'activité cellulaire par la calmoduline s'exerce de plusieurs façons. Au niveau le plus simple, la calmoduline stimule directement un certain nombre d'enzymes, en présence d'une concentration appropriée de  $Ca^{++}$ .

Certains de ces enzymes, comme la phosphorylase kinase, sont eux-mêmes responsables de la coordination de cascades enzymatiques et servent d'amplificateurs du signal  $Ca^{++}$ . La calmoduline contrôle également le taux de nucléotides cycliques via la phosphorylase et l'adénylate cyclase.

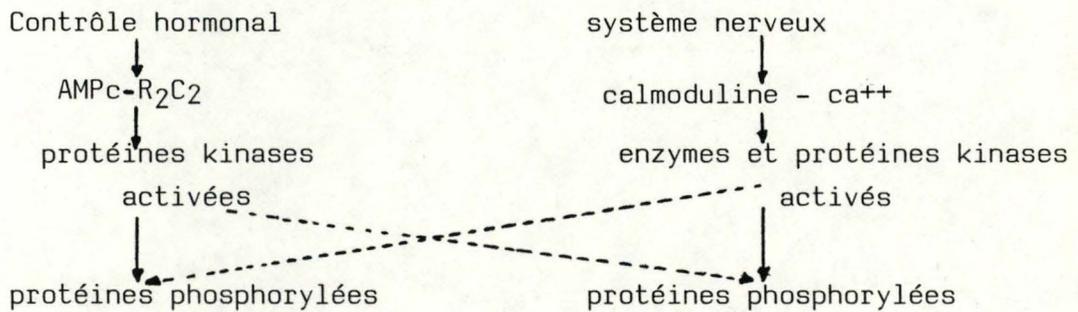
Dans la majorité des tissus, elle contrôle le taux de dégradation des nucléotides cycliques, et donc, l'activité catalytique des protéines kinases, en agissant sur la phosphodiesterase.

Une seule des différentes formes de phosphodiesterase est activée par la calmoduline: cet enzyme hydrolyse l'AMP cyclique pour lequel elle manifeste un  $K_m$  élevé ( 100 M) et le GMP cyclique mais cette fois avec un  $K_m$  faible ( 5 à 20 M).

L'activation par la calmoduline se fait en deux étapes: la calmoduline fixe d'abord le  $Ca^{++}$ , et ensuite le complexe calmoduline- $Ca^{++}$  fixe la phosphodiesterase et l'active. Inversement, au niveau du cerveau, elle stimule l'adénylate cyclase et contrôle ainsi la synthèse de l'AMP cyclique.

Jusqu'à présent, aucun rôle de calmoduline n'a été mis en évidence dans la synthèse du GMP cyclique, bien que certaines préparations de guanylate cyclase soient stimulées par le calcium.

Enfin, de nombreux enzymes contrôlés par le complexe calmoduline- $Ca^{++}$  ou des kinases dépendantes de ces complexes, servent également de substrats à des protéines kinases A. Ainsi, ces deux systèmes à second messenger (AMPc et  $Ca^{++}$ ) sont fonctionnellement couplés et intégrés au niveau des phosphorylations de protéines.



## II. 8. Les effecteurs de kinase.

### I. Le rôle des cations divalents.

Les protéines kinases sont actives uniquement en présence de cations divalents. L'ion  $Mg^{++}$  est le cofacteur habituel. Sa concentration optimale in vitro se situe généralement entre 10 et 40 mM, sa présence réalise les conditions optimales pour activation par l'AMP cyclique.

D'autres ions peuvent jouer un rôle similaire; c'est le cas du  $Ca^{++}$ ,  $Mn^{++}$ . Toutefois, ils donnent généralement une activité catalytique moindre. Remarquons aussi que si le  $Mg^{++}$  est remplacé par la  $Ca^{++}$ , bien qu'on observe une activité catalytique de base, aucune stimulation par l'AMPc n'apparaît.

### 2. Le rôle du pH.

En l'absence de nucléotides cycliques, les protéines kinases A présentent une activité catalytique peu dépendante du pH entre 6,0 et 8,0. En présence d'AMP cyclique, l'activité catalytique est plus dépendante du pH; en effet, le degré de stimulation par ce nucléotide est fonction de ce paramètre.

Un pH de 6,5 semble être optimal tant pour l'activité catalytique que pour la stimulation par l'AMP cyclique. Les protéines kinases dépendantes du GMP cyclique montrent un comportement différent face aux variations du pH. La stimulation par le GMP cyclique est maximale entre pH 5,0 et 7,0.

A des pH supérieurs, l'activité enzymatique de ces kinases augmente et atteint même des valeurs proches de celles obtenues par le GMP cyclique. Ceci suggère qu'il existe certainement des modifications dans l'équilibre entre forme active et inactive aux pH élevés.

### 3. Le rôle des nucléotides cycliques.

La fonction de ces molécules a été explicitée clairement dans les paragraphes précédents.

Rappelons néanmoins qu'ils sont absolument nécessaires pour l'activité de certaines protéines kinases puisqu'ils sont responsables de leur dissociation en sous-unités régulatrices et catalytiques. Dès lors, les molécules qui détruisent les nucléotides cycliques affectent indirectement les protéines kinases. Parmi elles, les phosphodiesterases hydrolisent les nucléotides cycliques; ainsi, l'AMP cyclique est dégradé en 5'-AMP, inactif sur les protéines kinases. Il en est de même pour le GMP cyclique. Il n'est pas certain qu'il existe une spécificité des phosphodiesterases envers les nucléotides cycliques.

L'hydrolyse des nucléotides cycliques par ces enzymes, peut être inhibée par les méthylxanthines, la théophylline et plus faiblement par la caféine.

Un inhibiteur de l'AMP cyclique a également été identifié dans de nombreux tissus comme le cerveau ou les poumons de mammifères. Il serait de nature identique à l'AMPC car les phosphodiesterases l'hydrolysent. Il résiste aussi bien aux phosphatases qu'à la trypsine, ce qui indique qu'il n'est pas de nature protéique. Cette molécule n'est pas thermostable; à pH neutre, elle ne résiste que quelques minutes à l'ébullition. Après quelques semaines de stockage à - 20°C, cet inhibiteur perd la totalité de son activité. (Murad & al, 1974).

#### 4. L'"inhibiteur"

Trois types de protéines thermostables inhibitrices des protéines kinases ont été étudiées:

- 1) le premier "inhibe" exclusivement les protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique.
- 2) le second agit également sur les kinases du type A et aussi sur les phosphodiesterases.

Ces deux premiers inhibiteurs sont repris sous le nom commun d'inhibiteurs de type I.

- 3) quant au troisième type, il inhibe la phosphorylation des protéines catalysée par certaines kinases dont celles dépendantes de l'AMP cyclique. Il a été désigné comme étant l'inhibiteur de type II.

#### 4.1.1. Découverte de l'inhibiteur.

En 1966, Appleman (& al) étudie les facteurs qui influencent la transformation in vitro, de la glycogène synthase du muscle de rat de forme inactive en forme active. Il met en évidence que les réactions dépendantes de l'AMP cyclique subissent une nette inhibition par un facteur présent dans le surnageant.

En 1968, Ashby & Walsh tentent de purifier ce facteur à partir du muscle de rat.

Cette molécule est également présente chez les invertébrés.

Donnelly & al. (1973) la retrouvent au niveau du muscle abdominal d'un crustacé décapode, le homard. Cet inhibiteur de protéine

kinase dépendante de l'AMP cyclique est capable de stimuler celles qui sont dépendantes du GMP cyclique.

Cette propriété soit, inhibitrice, soit activatrice selon le type de substrat, lui ont valu le nom de modulateur.

En 1975, Kuo & Kuo ont vérifié s'il ne s'agissait pas également d'un modulateur dans les tissus de vertébrés. Ils retrouvent ce que Appleman (1966) et Ashby (1968) ont décrit: une molécule inhibitrice des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique.

De plus, ils découvrent à hauteur de ces mêmes tissus une protéine stimulatrice des kinases dépendantes du GMP cyclique. Cette protéine stimulatrice est bien distincte de l'inhibitrice, mais elles forment ce que l'on appelle "le" modulateur.

#### 4.1.2. Caractéristiques.

Chez les vertébrés, l'inhibiteur est de type protéique; il est en effet détruit par la trypsine et la chymotrypsine. Son activité ne subit aucune modification après traitement à la RNase, à la phospholipase ou au lysosyme. Paradoxalement, cette protéine est très stable aux hautes températures; la chauffage à 95°C pendant vingt minutes n'altère pas son activité.

Cette molécule est acide, son point isoélectrique est de pH 4,2. L'intensité de l'inhibition dépend du substrat phosphorylé; la phosphorylation de la protamine paraît moins inhibée que celle des histones ou de la caséine.

Le coefficient d'extinction de l'inhibiteur à 280 nm est plus faible que celui des autres protéines. Le stockage de cette molécule à - 20°C, même pendant un an, n'altère pas son activité biologique.

Plusieurs poids moléculaires ont été proposés:

Selon Ashby & Walsh (1968) qui ont travaillé sur le muscle de rat, l'inhibiteur aurait un PM de 26.000 daltons.

Selon Demaille & al. (1977) qui étudient l'inhibiteur au niveau du muscle squelettique de lapin, le PM se situerait aux alentours de 11.300 daltons. La raison de cette diminution du poids moléculaire est inconnue, mais ils l'expliquent comme pouvant refléter différents états d'agrégation de la molécule.

Chez le homard, le modulateur est également de type protéique acide, sensible aux enzymes protéolytiques. Sa caractéristique principale est sa résistance exceptionnelle à la température, en effet, il ne subit pas d'altérations par chauffage à 100°C pendant cinq heures. Son poids moléculaire minimal a été estimé à 34.000 daltons par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate.

L'intensité de l'inhibition dépend également du type de substrat phosphorylé. Il semblerait que l'utilisation de protamine en tant que substrat lèverait l'inhibition du modulateur sur les protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique.

Le modulateur provenant du muscle de homard exerce aussi une nette inhibition sur les protéines kinases A d'origine mammaliennes. Il n'existe donc pas de spécificité vis-à-vis de la kinase (Donnelly, 1973).

#### 4.1.3. Mode d'action de l'inhibiteur.

L'inhibiteur est inefficace sur les protéines kinases natives. Il se combine aux sous-unités catalytiques libérées par l'AMP cyclique. Il peut de plus contrôler la dissociation de ces kinases; en effet, Walsh & Ashby (1971) ont pu mesurer une augmentation de la constante d'association de l'AMP cyclique aux kinases en présence d'inhibiteur. L'inhibiteur n'interagit ni avec l'ATP, ni avec la substrat, pas plus qu'avec l'AMP cyclique (Walsh, 1971).

*l'inhibiteur ne  
module pas ...*

#### 4.1.4. Conditions physiologiques affectant le taux d'inhibiteur.

Walsh & Ashby (1973) ont mesuré une diminution dans la concentration en inhibiteur dans le coeur de lapin après un jeûne prolongé. Lorsque l'animal est renourri, le taux retourne à des valeurs normales. Skala & al. (1974) mesurent une diminution de la concentration en inhibiteur dans les dix jours suivant la naissance. Des modifications dans l'activité du modulateur du pancréas ont également été observées lorsque les animaux sont traités à l'alloxane. Cette molécule détruit sélectivement les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine, induisant donc un diabète chez les individus traités. (Kuo, 1975).

#### 4.2. L'inhibiteur des kinases A et de phosphodiesterases.

Beale & al. (1977) découvre au niveau des cellules de Sertoli du testicule de rat, un inhibiteur de kinases A. Il diminue également l'activité enzymatique des phosphodiesterases agissant sur l'AMP cyclique. Cette molécule est de nature protéique, thermostable lorsque mise à 95°C pendant cinq minutes et relativement acide; son pH isoélectrique se situe vers 4,4. Sa concentration intracellulaire est proche de 0,3  $\mu$ M. Certaines conditions physiologiques modifient l'inhibition. Ainsi, après une hypophysectomie ou après traitement à la Follicle-Stimulating Hormone (FSH), on observe une diminution de la concentration en inhibiteur. Le mécanisme d'action n'a pu être élucidé.

#### 4.3. L'inhibiteur de type II.

Ce type d'inhibiteur a été isolé par Szmigielski & al. (1976) à partir du cerveau de rat. Il s'agit également d'une protéine très thermostable, dont l'activité enzymatique est totalement indépendante de la concentration en  $Ca^{++}$ . Son poids moléculaire a été estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate, à 14.500 daltons.

L'inhibiteur de type II se retrouve également dans le pancréas, le muscle squelettique, et même dans le muscle abdominal de homard.

A l'inverse des inhibiteurs de type I, il entre en compétition avec les substrats protéines des kinase. Dès lors, l'activité de cet inhibiteur n'est pas limitée par le nombre de sous-unités catalytiques libres, comme l'est l'activité des inhibiteurs de type I. Certaines conditions peuvent affecter l'activité de l'inhibiteur de type II. Certaines drogues (harmaline et diazepam) en effet le modulent à hauteur du cerveau de rat.

### III. Corrélation entre phosphorylation et facteurs hyperglycémiant.

L'effet hyperglycémiant du glucagon et des bioamines comporte des réactions de phosphorylation.

#### III. 1. Le glucagon.

Kagimoto (1979) étudie les modifications dans les phosphoprotéines hépatiques après injection de glucagon in vivo chez le rat. Pour pouvoir mesurer des différences, les individus traités sont injectés avec du phosphore radioactif.

Sous l'effet du glucagon, la phosphofructokinase qui intervient dans la glycolyse est trois fois plus phosphorylée.

Garrison a montré récemment que le glucagon stimule la phosphorylation d'une dizaine de protéines dans les hépatocytes. Il déclare n'avoir pas pu montrer de bande correspondant à la phosphofructokinase; il semblerait que la technique employée manquait de sensibilité pour pouvoir la détecter.

Kagimoto (1979) a pu montrer que l'activation de la phosphorylation se fait via une augmentation de la concentration du deuxième messenger, l'AMP cyclique.

Il est intéressant de signaler que l'optimum d'activité de la phosphofructokinase obtenu dans des conditions de saturation en substrat, est identique lorsqu'elle est phosphorylée ou déphosphorylée. En fait, l'enzyme sous forme déphosphorylée, serait moins sensible à l'inhibition de l'ATP.

### III. 2. Sérotonine et octopamine.

Les effets de ces deux bioamines sur la phosphorylation des protéines ont été mises en évidence dans le ganglion abdominal d'un mollusque gastéropode marin, Aplysia californica (Levitan & al, 1974). Pour les deux substances, l'incubation du ganglion a amené une nette augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire. Le traitement à la sérotonine a induit la phosphorylation de plusieurs protéines de poids moléculaires compris entre 15.000 et 120.000 daltons. L'octopamine, quant à elle, n'induit la formation que d'une seule phosphoprotéine de poids moléculaire égal à 120.000 daltons.

La cascade de réactions correspond vraisemblablement au schéma proposé pour les vertébrés: hormone  $\longrightarrow$  second messenger  $\longrightarrow$  protéine kinase  $\longrightarrow$  phosphoprotéine; En effet, lorsque les ganglions sont incubés avec de l'AMPc on observe les mêmes types de phosphoprotéines que celles obtenues avec l'hormone. Levitan a tenté de les localiser au niveau subcellulaire. Après fractionnement, elles ont été repérées à hauteur de la fraction mitochondriale brute (différente de la fraction nucléaire).

Chez le homard, la stérotone induit la phosphorylation d'une protéine de 29.000 daltons dans le muscle des pinces. Cette réaction peut être amplifiée en présence des nucléotides cycliques comme l'AMP et le GMP cycliques. La présence de  $Ca^{++}$  diminue sa phosphorylation. Dans d'autres organes ( les branchies et les ganglions thoraciques) une protéine phosphorylée de 29.000 daltons apparait aussi après traitement à la sérotonine. A hauteur de ces organes, l'AMP cyclique joue un rôle activateur alors que le GMP cyclique est sans effet. Dans le coeur et les ovaires, on rencontre cette même phosphoprotéine; sa phosphorylation est totalement indépendante de tout nucléotides cycliques (Goy, 1984).

#### IV. Etude du ou des facteur(s) hyperglycémiant(s) chez les crustacés.

La glycémie correspond au taux de glucose dans le sang. Chez les vertébrés, le taux normal est de 1 gr/litre de sang. Il est étroitement contrôlé par le système endocrinien (glucagon, insuline, adrénaline, glucocorticoïdes), ce qui se traduit par une grande stabilité du système.

L'hypoglycémie et l'hyperglycémie sont donc deux situations relativement exceptionnelles ou pathologiques. Chez les crustacés, la glycémie est plus faible et peut prendre des valeurs comprises entre 50 et 300 mg/litre. Ce taux de glucose, variable d'un individu à l'autre subit des modifications circadiennes et saisonnières, ainsi que des modifications dues à la température, aux phénomènes de mue et de reproduction et même de stress.

##### IV. 1. Découverte d'un facteur hyperglycémiant.

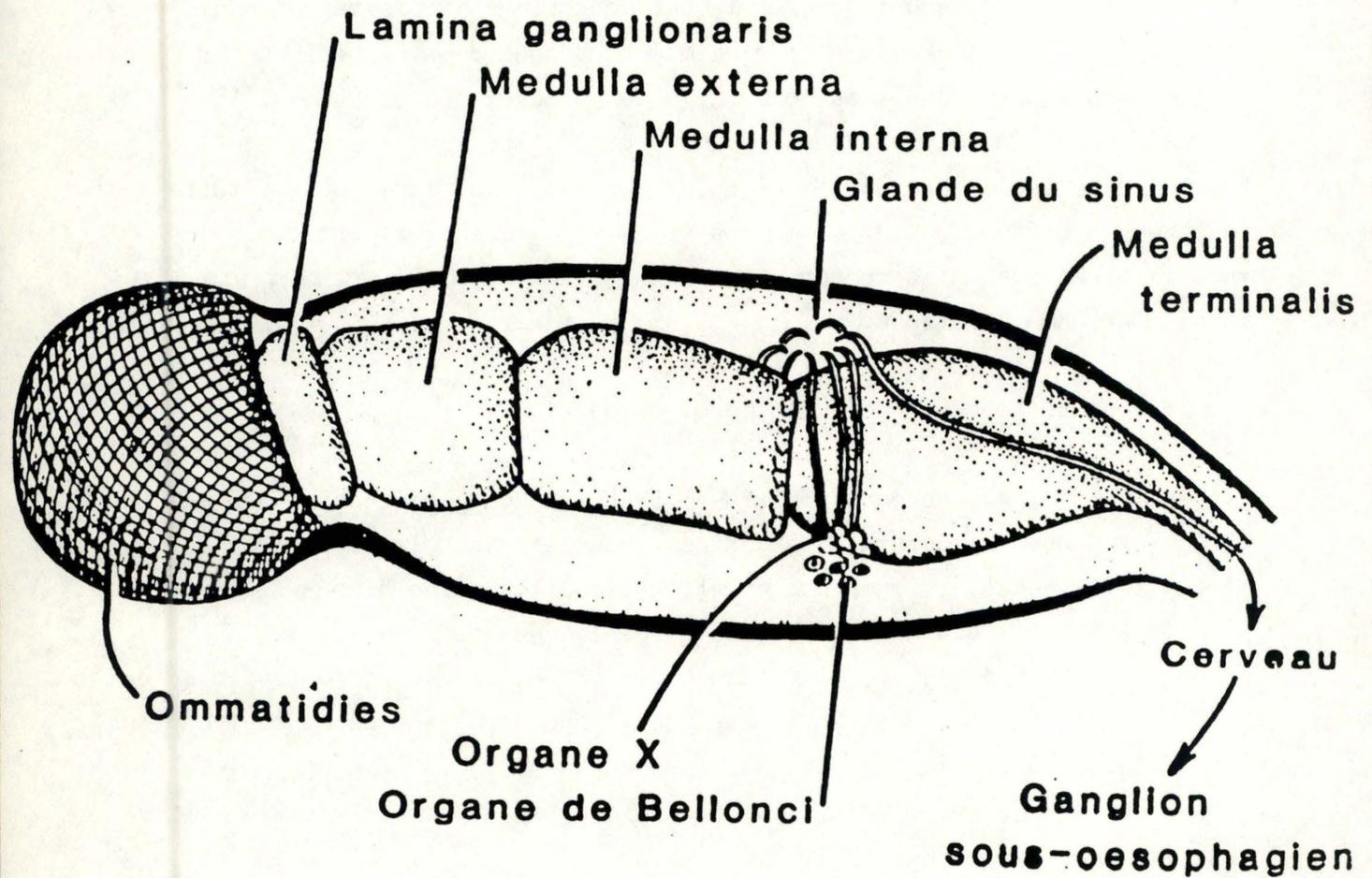
En 1944, Abramowitch travaillant sur Uca pugilator met en évidence l'importance du pédoncule oculaire sur la régulation de la glycémie. Il remarque en effet que l'injection d'un extrait de pédoncules oculaires élève la glycémie endéans l'heure.

Il met également en évidence une corrélation entre doses injectées et effets observés. De là est née l'idée d'un facteur hyperglycémiant localisé au niveau des pédoncules oculaires. Son existence a été confirmée chez d'autres espèces de crustacés par Kleinholz & Little (1949) et par Kleinholz & al (1950)

##### IV. 2. Les pédoncules oculaires : Structure et neurosécrétions.

###### A. Structure des P.O.

Chez les crustacés dotés de pédoncules oculaires, au cours de l'embryogénèse, les quatre lobes optiques (lamina ganglionaris, médulla externa, médulla interna et médulla terminalis) se détachent du cerveau, tout en lui restant relié et migrent dans les pédoncules.



SCHEMA ILLUSTRANT LA STRUCTURE D'UN PEDONCULE OCULAIRE  
 DE CRUSTACE.

On distingue à proximité de ces lobes, différentes masses glandulaires:

- A la base de la médulla terminalis, une masse cellulaire constitue l'organe X encore appelé organe de Hanström. Cette structure est responsable de la synthèse de l'hormone inhibitrice de la mue: MIH (Molt Inhibiting Hormone).
- A proximité de l'organe X, on trouve des cellules en "oignons" constituant l'organe de Bellonci. Celui-ci secréterait des substances stimulant l'organe Y responsable de la synthèse de l'hormone de mue.
- Dorsalement, proche de la médulla interna et de la médulla terminalis, se trouve la glande du sinus.

Il s'agit en fait d'un organe neurohémal formé par la confluence de nombreux neurones entourant un vaisseau sanguin. Les neurones qui y aboutissent, proviennent de l'organe X, de certaines cellules nerveuses du protocérébron et du ganglion thoracique. Cette glande sinusaire a donc un rôle de stockage et de libération de différents facteurs.

#### B. Neurosécrétions.

Ces neurosécrétions contrôlent de nombreux processus métaboliques (Kleinholz, 1976 & Kamamoto, 1976).

Parmi elles, citons:

- La MIH<sup>1</sup> ou Molt Inhibiting Hormone qui est sécrétée par l'organe X. stockée et libérée par la glande sinusaire. Son rôle est d'inhiber des processus impliqués dans la mue.  
Chez certaines espèces de crustacés, ce facteur peut également induire le développement des gonades.
- L'hormone diurétique qui contrôle l'absorption d'eau par les tissus tégumentaires lors de la mue.  
Elle est synthétisée dans les ganglions sous-oesophagiens et est amenée par des axones à la glande du sinus pour y être stockée.
- Les chromatophorotropines qui induisent la dispersion ou la concentration des pigments des chromatophores. Ces facteurs sont également stockés dans la glande sinusaire.
- Les facteurs régulateurs de la respiration.
- Le facteur hyperglycémiant stocké également dans la glande du sinus.

#### IV. 3. Purification et identification de l'hormone hyperglycémiant.

Keller (1977) prépare un extrait de la glande du sinus et le soumet à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Il essaye de localiser à hauteur de la bande correspondant à l'effet hyperglycémiant une immunoréaction au glucagon (hormone hyperglycémiant des vertébrés). Il n'obtient aucun résultat positif. Il montre finalement qu'il existe de nettes différences entre ces deux hormones tant au point de vue du nombre que de la composition en acides aminés.

De plus, l'injection de glucagon n'amène pas d'hyperglycémie chez les crustacés.

Chez Carcinus moenas, l'hormone hyperglycémiant a été identifiée par Keller & Wunderer (1978). Elle est constituée de cinquante sept acides aminés dont la majorité est représentée par l'acide aspartique et l'acide glutamique, et a un poids moléculaire de 6.727 daltons.

Une telle composition en a.a. explique la mobilité de l'hormone vers l'anode. Ceci a également été démontré chez d'autres crustacés par Andrew & Saleudoin (1979) .

En 1980, Keller travaille sur Orconectes limosus et essaye, à partir de la glande du sinus, d'isoler un neuropeptide hyperglycémiant. L'hormone isolée dans ce cas est différente de celle qu'il isole à partir du crabe Carcinus moenas. Les différences se situent aussi bien au niveau de la composition en acides aminés que de son point isoélectrique. Toutefois, les deux hormones ont le même nombre d'acides aminés et sont de même nature protéique; de plus, dans les deux cas, un azote terminal et deux ponts disulfure ont été identifiés.

En conclusion, l'existence d'une ou plusieurs hormone(s) dans les pédoncules oculaires est admise et n'est plus à démontrer. Cependant, il serait hasardeux d'affirmer un poids moléculaire unique de 7.000 daltons. Ainsi, Skorkowski & al. (1977) cherchant à isoler, à partir d'un extrait de P.O. de la crevette Cangron cangron, un facteur possédant une action hyperglycémiant ont trouvé deux peptides de poids moléculaire proche de 20.500 et de 7.300 daltons.

Chez P. serratus, le peptide hyperglycémiant a un poids moléculaire de plus ou moins 3.000 daltons, estimé par filtration sur séphadex G.50.

D'autre part, C. Devos (1980) a purifié à partir d'un extrait de P.O. du homard Homarus americanus, par passage sur une colonne de DEAE-cellulose,

trois facteurs hyperglycémiantes. Aucun de ceux-ci ne correspondaient à 7.000 daltons, ce qui n'exclut cependant pas son existence.

Ces expériences sont en accord avec l'hypothèse de Kleinholz & Keller (1973) selon laquelle il existerait plusieurs hormones hyperglycémiantes au niveau des P.O.

A ce propos, il serait intéressant de vérifier s'il n'existe pas une pro-hormone de plus ou moins 20.500 daltons à l'origine des différentes sous-unités dont on vient de parler.

Il est possible actuellement d'identifier les cellules responsables de la sécrétion hormonale. Cela se réalise en isolant l'hormone hyperglycémiante, qui après purification est injectée à un animal. Celui-ci réagit en produisant des anticorps dirigés contre l'hormone. Il suffit alors de les récupérer et de les marquer soit par des molécules fluorescentes (fluorescéine par exemple) soit par un isotope radioactif et de les mettre en contact avec les coupes histologiques de P.O. De cette manière, Jaros & Keller (1979) ont mis en évidence que seules les cellules de l'organe X dont les axones confluent vers la glande du sinus sont marqués par immunoréaction chez Carcinus moenas. Gorgels-Kallen & Van Herp (1980) travaillant de la même façon sur les pédoncules oculaires de l'écrevisse Astacus leptodactylus, ont identifié ainsi des cellules possédant des granules de neurosécrétion. Gorgels-Kallen & al. (1982) continuent leur étude sur différents Astacidae tels que Orconectes limosus, Nephrops norvegicus, Homarus gammarus et Palinurus vulgaris. Les sites positifs au point de vue immunoréaction sont exclusivement situés au niveau de la glande du sinus et de l'organe X. Ils correspondent aussi bien au lieu de production, de stockage qu' à celui de libération de l'hormone. Remarquons également qu'il existe une réaction positive dans le cas de l'utilisation d'un antisérum dirigé contre l'hormone hyperglycémiante de Palaemon serratus sur les coupes de P.O. d'un décapode brachyoure tel que Macropipus puber.

#### IV. 4. Spécificité de l'hormone hyperglycémiante.

Des études comparatives sur l'activité biologique des hormones hyperglycémiantes ont été réalisées sur différents crustacés décapodes. Kleinholz & Keller (1973) isolent à partir de l'écrevisse Orconectes limosus, un facteur hyperglycémiant qu'ils testent sur d'autres écrevisses

telles que Procambarus clarkii, Pacifastacus leniusculus. L'effet hyperglycémiant est observé. Toutefois, les mêmes tests réalisés avec ce facteur sur différents crabes, dont Cancer magister et Uca pugilator sont négatifs. La démarche expérimentale inverse a également donné des résultats négatifs: le facteur isolé à partir de pédoncules oculaires de crabes n'a aucune action significative sur la glycémie des écrevisses. De façon plus générale, les facteurs hyperglycémiantes d'individus macroures ne présentent aucune activité biologique sur les individus brachyours et vice versa.

Des études plus poussées ont permis de mettre en évidence les caractéristiques physico-chimiques propres à ces différents facteurs. Keller & Kleinholz (1973) montrent que les hormones hyperglycémiantes du crabe Cancer magister, de la crevette Pandalus jordani et de l'écrevisse Orconectes limosus présentent non seulement des comportements différents sur colonne échangeuse d'ions mais également dans un champ électrique lors d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Keller (1977) confirme ces résultats. Il soumet des extraits de pédoncules oculaires de crustacés décapodes à des électrophorèses sur gel de polyacrylamide. Il observe que les hormones interspécifiquement actives obtenues à partir de quatre espèces d'écrevisses (Astacus astacus, Astacus leptodactylus, Orconectes limosus et Procambarus clarkii) présentent la même mobilité électrophorétique. Néanmoins, celle-ci paraît plus faible que celle des hormones hyperglycémiantes d'espèces brachyours telles que, Carcinus moenas, Uca pugilator et Cancer magister.

#### IV. 5. Mode d'action et organes-cibles de l'hormone hyperglycémiante.

L'effet de l'hormone peut se manifester sur différentes séquences métaboliques, notamment sur le mécanisme de la glycogénolyse et de biosynthèse du glycogène.

Schwabe (1952) mesure une augmentation du stock de glycogène dans le tégument de Panulirus japonicus après ablation des pédoncules oculaires. Cet effet a également été observé dans le muscle abdominal de Cambarus affinis par Keller (1975). De même, Ramamurthy & al. (1968) constatent chez différents crabes que l'ablation des P.O. stimule l'incorporation du D - [(u) - <sup>14</sup>C] - glucose au glycogène du muscle. Inversement, l'injection d'extrait de P.O. l'inhibe.

Keller & Andrew (1975) suivent la diminution du taux de glycogène dans le muscle abdominal et dans les gonades d'Orconectes limosus après traitement à l'hormone hyperglycémisante. Des résultats similaires ont été obtenus à hauteur des branchies et des tissus tégumentaires d'Uca pugnator. Dans toutes les expériences, il mesurent une augmentation du glucose dans l'hémolymphe. Telford (1975) confirme ces résultats en travaillant sur le muscle de Cambarus robustus in vitro. Il observe qu'un muscle traité avec des P.O. rejette du D - glucose. Par contre, l'hépatopancréas traité de la même manière ne montre aucune libération de glucose.

Par ailleurs, Parvathy (1972) mesure au niveau de l'hépatopancréas, suite à un traitement à l'extrait de P.O. une augmentation du glycogène.

D'autres études plus fines ont permis de localiser l'action de l'hormone sur certains enzymes.

Chez le crabe Cancer magister, l'extrait de P.O. inhibe l'activité de l'enzyme qui catalyse la synthèse du glycogène, c'est-à-dire de l'UDPG - glycogène transglucosylase (Wang & Sheer, 1963).

Chez Cambarus affinis, l'ablation des pédoncules oculaires induit une augmentation dans le muscle de la forme active de l'UDPG transglucosylase (Keller, 1966).

Keller a de plus montré des variations de l'activité phosphorylasique du muscle abdominal de Cambarus affinis suite au traitement à l'extrait de P.O. Ainsi, chez les individus épédonculés, la phosphorylase b augmente. Or, la phosphorylase contrôle la dégradation du glycogène; sous forme a, (active) elle permet la libération de glucose -1- phosphate lorsqu'elle est sous b, (inactive), du glycogène peut s'accumuler.

L'injection des P.O. rétablit le taux normal.

L'hormone hyperglycémisante peut également moduler le taux de nucléotides cycliques.

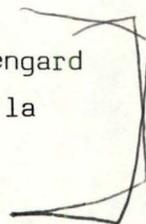
Spindler & al, (1975) ont élucidé le lien qui peut exister entre nucléotides cycliques et glycémie. L'étude a été réalisée sur deux espèces de crabes. Dans ces deux cas, l'injection d'AMPc augmente la glycémie. La réponse à l'injection de GMPc n'a été obtenue que chez une seule espèce. Il faut cependant remarquer que la réaction à l'injection de l'AMPc est plus importante chez les individus normaux que chez les individus épédonculés. Keller & Seldmeir (1978) injectent l'hormone purifiée à l'écrevisse Orconectes limosus.

Ils observent une nette augmentation du taux de l'AMPc et de GMPc dans le coeur, l'hépatopancréas, le muscle abdominal et dans les glandes antennaires. Cette réponse est significative après deux minutes et le taux initial est rétabli après dix minutes.

Sous certaines conditions, une faible augmentation des nucléotides cycliques a été observée dans l'hémolymphe mais on ignore si celle-ci s'accompagne d'un relargage du glucose dans la circulation.

Etant donné qu'il existe des protéines kinases chez les crustacés (Greengard 1969), l'action de l'hormone hyperglycémiant pourrait s'expliquer par la fixation de ces nucléotides cycliques sur ces kinases, favorisant la phosphorylation d'enzymes.

dist



#### IV. 6. Autres facteurs hyperglycémiant.

Certaines bioamines induisent également une hyperglycémie chez les crustacés.

Bauchau & Mengeot (1966) testent l'effet de la sérotonine. Celle-ci produit une hyperglycémie chez le crabe chinois (Eriocheir sinensis, 1968). Ils prélèvent deux pattes homologues d'un même individu et isolent le muscle du mérus. Lorsque les muscles sont incubés en présence d'extrait de P.O., la phosphorylase a subi une augmentation de cinquante trois voire même soixante trois pour cent. Celle-ci permet la libération de glucose à partir du glycogène. Le traitement à la sérotonine produit les mêmes résultats. De plus l'AMPc mis en solution avec un homogénat musculaire élève la glycémie de la même manière que les P.O et la sérotonine.

Bruart (1978) étudie les effets de la dopamine sur la glycémie du homard Homarus americanus. Cette catécholamine est largement distribuée chez les invertébrés et donc doit y avoir un rôle biologique. Il constate que l'injection de dopamine induit une hyperglycémie et que celle-ci ne se fait pas par l'intermédiaire de la glande du sinus. En effet, un individu épédonculé répond également par une augmentation du taux de glucose dans l'hémolymphe. On peut donc penser que cette substance a une action directe au niveau des tissus. Renard (1980) approfondit les recherches de Bruart sur le même animal. Par injection de dopamine "marquée", elle met en évidence l'existence de récepteurs à hauteur de plusieurs organes. Parmi eux, il y a le coeur, les branchies, l'hépatopancréas et les ovaires. Ces organes sont également des cibles de l'hormone hyperglycémiant présente dans les pédoncules oculaires.

L'octopamine a également été identifiée chez les crustacés. Outre son rôle de neurotransmetteur, elle possède également une action hyperglycémiant. Battele & Kravitz (1977) ont étudié son action au niveau du coeur, de l'hémolymphe et du muscle squelettique. Ces organes répondent à l'injection d'octopamine par augmentation du taux d'AMPc et par une hyperglycémie. Renard (1980) a également étudié son effet sur le homard Homarus americanus. Elle a pu montrer qu'il existe des sites récepteurs dans certains organes: les branchies, le coeur, l'hépatopancréas et que l'octopamine produit une hyperglycémie dépendante du taux de glucose initial.

## ORIENTATION DU TRAVAIL.

Chez les vertébrés, de nombreuses voies métaboliques sont modulées par des mécanismes de phosphorylation - déphosphorylation sous contrôle hormonal. Il est nettement établi quoique beaucoup moins approfondi, que de telles réactions existent également chez les invertébrés, dont les crustacés; il est donc intéressant de les étudier et d'essayer de les caractériser.

Certains organes-cibles de l'hormone hyperglycémisante nous serviront de matériel: le coeur, les branchies et l'hépatopancréas. En effet, puisqu'il semble exister chez les crustacés, une séquence parallèle avec la stimulation hormonale de la glycogénolyse des vertébrés, il doit également y avoir dans ces organes des phosphorylations par les protéines kinases endogènes.

Le but de ce travail est l'étude de ces phosphorylations de substrats protéiques endogènes par les protéines kinases endogènes; nous travaillons donc principalement sur des homogénats bruts ou sur des extraits réalisés à basse vitesse (1.500 g).

Nous suivrons deux voies d'investigation: La première correspond à l'étude "in vitro" des phosphorylations. Cette approche permet d'isoler le système de tout contrôle nerveux ou endocrinien ainsi que des modulations cycliques ou autres auxquelles ces animaux sont soumis. Dans ce cadre expérimental, nous tenterons de définir les conditions permettant d'obtenir des phosphorylations. Un système exogène performant nous indiquera si oui ou non la réaction est possible dans ces conditions. Après cette mise au point technique, nous aborderons l'étude de la cinétique de la réaction et l'action de divers effecteurs.

La seconde voie d'investigation consiste en une étude "in vivo". L'injection de  $\text{Na H}_2 \text{PO}_4$  radioactif nous permettra de suivre sa cinétique de disparition dans l'hémolymphe, de vérifier sa capture par certains organes (coeur, branchies, hépatopancréas) et de mesurer son incorporation aux protéines.

L'étape finale consistera en un essai de caractérisation des différentes protéines phosphorylées par des techniques d'électrophorèses en plaque et d'autoradiographie.

MATERIEL & METHODES

A - TECHNIQUES.

B - DOSAGES.

## PRINCIPAUX PRODUITS.

Acide éthylène diaminotétranique, sel sodique (Merck)	EDTA
Acide trichloracétique (UCB)	TCA
Acide sulfosalicylique (Merck)	
Adénosine 5' - $^{32}\text{P}$ triphosphate sous forme de sel de triéthylammonium (Amersham)	
Dithiothréitol (Janssen chimica)	
Phénylméthylsulfonyl fluoride	PMSF
Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (Calbiochem-Behring.Corp.)	TRIS
Sodium dodécyl sulfate (Merck)	SDS
Mercaptoéthanol (Merck)	
Séphadex G25 (Pharmacia Fine Chemical)	
Protéine kinase: dépendante de l'AMP cyclique, isolée à partir du coeur de bovin (Sigma)	
Dithiothréitol (Janssen chimica)	
AMP cyclique (Sigma)	
Ultrogel Aca 202 (LKB)	
- $^{32}\text{P}$ Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (NEN)	
Sérum albumine bovine (Merck)	SAB
Glucose oxydase (Sigma)	GOD
Peroxydase (Sigma)	POD
Protamine sulfate (Merck)	
O-dianisidine : ortho dianisidine soluble dans l'eau (Sigma)	
Aqualuma plus: liquide scintillant (Lumac)	
TEMED: N-N'-N'-N'- tatraméthyléthylène diamine (Flucka)	
IBMX Isobutyl méthyl Xanthine	

## A. TECHNIQUES.

### I. Prélèvement des tissus.

#### I.1. Prélèvement de l'hémolymphe.

L'hémolymphe est prélevée à l'aide d'une seringue stérile au niveau de l'artère dorsale, entre le thorax et le premier segment. Elle est ensuite placée dans un tube préalablement taré, contenant de l'EDTA 5%, initialement amené à pH 7,0 avec du Na OH 10 N.

Cette substance est utilisée pour son pouvoir anticoagulant. L'hémolymphe est diluée environ une fois et demi dans l'EDTA et maintenue dans de la glace fondante afin de ralentir au maximum tous les processus catalytiques dont la coagulation.

#### I.2. Prélèvement des organes.

L'animal est tué en sectionnant la chaîne nerveuse ventrale au moyen d'un scalpel. Nous prélevons l'hépatopancréas situé dans la région ventrale, au niveau du céphalothorax, le cœur situé dorsalement et les branchies localisées dans les chambres branchiales qui sont disposées latéralement. Les branchies sont débarrassées de la partie calcifiée. Ces différents organes sont séchés sur papier-filtre et découpés en petits morceaux en vue de l'homogénéisation.

### II. Homogénéisation.

Le broyage des tissus se fait au moyen d'un homogénéiseur de type Potter-Elvehjem constitué d'un tube en pyrex et d'un piston en téflon monté sur une foreuse tournant à 2.800 rpm (position lièvre). L'homogénéisation est réalisée par quatre passages au piston et dans deux milieux différents selon l'utilisation. Dans tous les cas, la quantité de tampon était égale à quatre fois le poids de l'organe.

### II. 1. Homogénéisation dans le tampon Pipès.

Ce type d'homogénat est utilisé dans les expériences d'incorporation de  $^{32}\text{P}$  in vitro. La concentration en Pipès est 0,4 M finale. On ajoute au milieu un inhibiteur de phosphodiesterases l'IBMX à concentration finale 2,5 mM préalablement mis en solution dans de l'alcool.

Dans le cas de l'hépatopancréas, on ajoute également un inhibiteur de protéases, du PMSF dont la concentration finale est de 1mM. Cette substance est également mise en solution dans de l'alcool.

### II.2. Homogénéisation dans le TCA.

Cette méthode qui permet d'obtenir un culot protéique a été utilisée principalement en vue d'électrophorèse. L'homogénat est réalisé dans un volume de TCA 5% égal à quatre fois le poids de l'organe. Nous le centrifugeons à 10.000 g pendant 15 minutes et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après élimination du surnageant dont un coussin de graisses, nous lavons deux fois le culot avec respectivement du TCA 10% et du TCA 15% à même volume que celui utilisé pour l'homogénéisation (dilution 5 fois). Le culot est repris dans quatre volumes d'un tampon particulier pour électrophorèse, soit une solution de Tris-HCl 0,75 M, SDS 10%, Mercaptoéthanol 5%, saccharose 17%, le tout à pH 8,6. Les échantillons sont bouillis 1 à 2 minutes et on y ajoute quelques mg du bleu de bromophénol.

### III. Méthode de phosphorylation "in vitro". (Rudolph and Krueger, 1979)

L'isotope radioactif qui nous permet de mesurer les phosphorylations de protéines est du phosphore 32 ( $^{32}\text{P}$ ). Il se fixe aux résidus serines des protéines. Son émission radioactive est de type  $\beta^-$ ; et sa demi vie, de 14,2 jours. Dans le cadre de nos expériences "in vitro", nous avons utilisé de l'adénosine 5'[- $\gamma$  -  $^{32}\text{P}$ ] triphosphate sous forme de sel de triéthylammonium. Au départ, son activité spécifique est de 3.000 Ci/mmoles et la concentration radioactive est de 10 mCi/ml.

mode opératoire

V.1.

La source de substrat comme celle de protéine kinase est représentée par 200  $\mu$ l d'homogénat dans du tampon Pipès. Le volume final du test est de 400  $\mu$ l : il a été enrichi en ion divalent, catalyseur de protéines kinases sous forme  $Mg Cl_2$  à concentration finale de 10 mM et un inhibiteur de phosphatases, le Na F à concentration finale de 50 mM. Lorsqu'il est indiqué dans les expériences, nous ajoutons de l'EDTA mM ou de l'AMP cyclique 100  $\mu$ M.

La mise en route des phosphorylations est commandée par l'addition de  $[\gamma - ^{32}P]$  ATP auquel a été ajouté de l'ATP froid à concentration finale de 10  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M selon les cas. La radioactivité a été calculée de manière à avoir environ 500 cpm/picomole. Après un temps déterminé de réaction, 50  $\mu$ l du milieu d'incubation sont déposés sur un papier filtre Whatman 3 MM. Ce papier est soumis à deux lavages de 10 minutes dans le TCA 10%, puis deux autres de 10 minutes dans de l'alcool dénaturé et finalement deux fois 10 minutes dans l'éther diéthylique. Le volume de ces bains est choisi pour avoir au maximum 10 ml de liquide par papier filtre. Ceux-ci sont ensuite séchés à l'aide d'un sèche-cheveux jusqu'à évaporation complète de l'éther. Ils sont mis alors dans des fioles de comptage contenant 4 ml de liquide scintillant (Aqualuma plus)

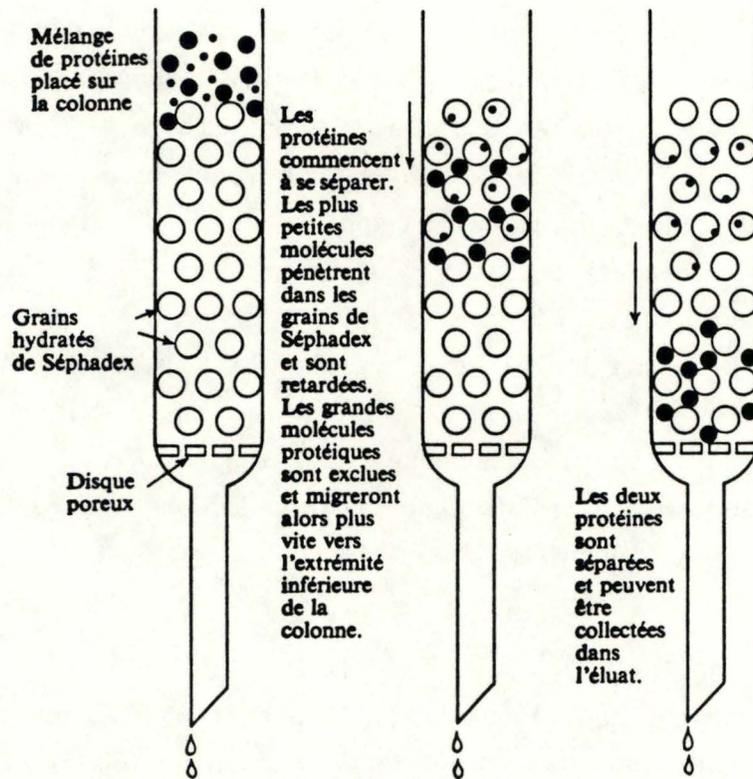
Les "blancs".

Des blancs sont réalisés en déposant sur le papier 45  $\mu$ l de test sans ATP; les protéines kinases sont dénaturées dans un bain de TCA 5%. Ensuite 5  $\mu$ l de la solution d'ATP sont ajoutés sur le papier et celui-ci subit les mêmes lavages que les papiers tests.

Le système de référence:

Il est constitué d'une protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique isolée à partir de coeur de bovin. 10 mgr de lyophilisat sont dilués dans 1 ml d'eau bidistillée; 20  $\mu$ l de cette solution sont employés par test. Le substrat est dans le cas présent la protamine sulfate. Celle-ci est une protéine basique particulièrement abondante chez les poissons: elle est riche en sérine et constitue donc un substrat intéressant pour les phosphorylations.

*Séparation de deux protéines de taille  
différente sur une colonne de Séphadex.*



Nous mettons 0,1 mgr. de protamine sulfate en solution dans un tampon Tris - HCl 20 mM contenant du glycérol 30% et du dithiothréitol 0,1 M; le tout à pH 7,4.

Ce système protéine kinase exogène - protamine sulfate diluée dans du Pipès -IBMX est traité de la même façon que l'homogénat.

#### IV. Chromatographie sur tamis moléculaire.

Les gels utilisés sont formés de dextran modifié, sous forme de perles percées de pores. Les molécules dont la taille est supérieure à celle des plus gros pores, c'est-à-dire supérieure à la limite d'exclusion de ce gel, ne peuvent y pénétrer. Elles migrent seulement dans la phase aqueuse qui entoure les grains du gel et sont donc éluées les premières. Par contre, les molécules plus petites pénètrent dans le gel et leur migration est ainsi retardée.

Les propriétés du gel sont définies par les paramètres suivants:

- le volume mort soit le volume d'éluution d'une substance totalement exclue du gel. Il représente donc le volume situé entre les grains. ( $V_0$ )
- Le volume d'éluution qui correspond au volume d'éluat nécessaire pour provoquer la sortie d'une substance de la colonne. ( $V_e$ ).
- Le volume relatif d'une substance qui correspond à  $V_e/V_0$ .
- Le volume total du gel ( $v_t$ ) qui est égal à  $V_e + V_0$

#### mode opératoire:

Nous avons utilisé un gel séphadex G 25 qui exclu les molécules de poids moléculaire supérieur à 5.000. Le gel se présente sous forme de poudre. Le gonflement a été effectué dans un excès de solvant ( $H_2O$  bidistillée) pendant une nuit. Le gel a été coulé dans une colonne sur une hauteur de 25 cm, ce qui correspondait à un volume mort de 5,2 ml. Elle a ensuite été équilibrée avec du tampon pipès à concentration finale de 0,4 M

#### V. Injection de $^{32}P$ "in vivo".

L'isotope choisi pour suivre la phosphorylation "in vivo" est aussi le phosphore 32 ( $^{32}P$ ). Dans ce cas, nous l'utilisons sous forme de sel de dihydrogénophosphate de sodium ( $Na H_2 PO_4$ ). Au départ, l'activité spécifique est de 1Ci/mmole et sa radioactivité de 10 mCi/ml.

mode opératoire:

L'animal destiné à l'expérience a été préalablement pesé. Il est placé dans une quantité connue d'eau de mer.

1 ml d'une solution de  $\text{Na H}_2 \text{PO}_4$  1 mM radioactif et d'acétate d'ammonium 0,05 M pH 8,0 lui est injecté à hauteur de l'artère dorsale au moyen d'une seringue stérile. La radioactivité spécifique est de  $400.10^6$  cpm/mM.

Des prélèvements d'hémolymphe sont effectués à intervalles de temps réguliers afin de suivre la cinétique de disparition du marqueur radioactif dans l'hémolymphe et, également, pour détecter la présence éventuelle de protéines phosphorylées circulantes. La détermination de la radioactivité associée aux protéines se fait par traitement d'un échantillon d'hémolymphe dans du TCA 10% froid comme décrit au § III.

Lors de chaque prélèvement d'hémolymphe, nous mesurons également la radioactivité de l'eau de mer.

Après huit heures d'expérience, l'animal est tué, les différents organes sont prélevés et congelés dans de l'azote liquide. Ces échantillons sont homogénéisés ultérieurement dans le TCA ( voir point II.2) en vue d'électrophorèses en plaque et d'autoradiographies. La radioactivité spécifique de l'hémolymphe et celle de l'eau de mer sont mesurées en prélevant avant injection le même volume que pour les tests.

#### VI. Préparation et injection d'une fraction hyperglycémiant (F.7) de pédoncules Oculaires.

50 pédoncules oculaires sont broyés au moyen d'un homogénéiseur de type Potter - Elvehjem dans 10 ml d'eau bidistillée. Après centrifugation à 10.000 g pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant est lyophilysé. L'équivalent de 10 pédoncules oculaires (= 74 mg) est repris par ml de  $\text{NH}_4 \text{AC}$  50 mM pH 8,0. Le tout est disposé sur une colonne (1,6 x 72 cm) contenant un gel ACA 202 et élué avec une solution de  $\text{NH}_4 \text{AC}$  50 mM pH 8,0. La fraction hyperglycémiant correspond aux protéines de poids moléculaires compris entre 4.000 et 12.500 daltons ( d'où sa dénomination de F.7). L'équivalent d'un demi pédoncule oculaire est injecté au homard dans l'artère dorsale. L'effet hyperglycémiant est mesuré par dosage dans l'hémolymphe à intervalles de temps déterminés.

Le homard témoin est injecté d'un ml de solution de Cole.

Sa composition est la suivante:

- Na Cl = 0,45 M (26,42 gr)
- K Cl = 15 mM ( 1,12 gr)
- Ca Cl<sub>2</sub> = 25 mM ( 2,78 gr)
- Mg Cl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub> O = 2mM ( 0,38 gr)
- Mg SO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub> O = 2 mM ( 0,48 gr)

Dans une solution d'acide borique 36 mM et de NaOH 50 M, le pH est égal à 7,4.

### VII. Détermination de la radioactivité dans les organes.

La radioactivité totale incorporée au niveau des organes se mesure en prélevant une quantité définie d'homogénat. Celle-ci est déposée sur un papier filtre Whatman 3 MM et introduit dans une fiole de comptage contenant 4 ml de liquide scintillant.

La radioactivité associée aux protéines est mesurée en déposant un volume d'homogénat connu sur le même type de papier que pour la totale et de le traiter par précipitation au TCA 10% comme indiqué au § III.

### VIII. Electrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate. (SDS).

On appelle électrophorèse le déplacement de particules chargées dans un champ électrique formé par un courant électrique continu.

La vitesse de migration est déterminée par la mobilité électrophorétique de la particule. Celle-ci dépend des caractéristiques propres de la molécule comme sa taille, sa charge ou son coefficient de dissociation.

Elle est modifiée par les conditions extérieures comme le temps de migration, la force ionique du milieu, sa température, son pH.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation de protéines.

Elle associe à la séparation des macromolécules en fonction de leur charge, une séparation en fonction de leur taille. Les gels forment en effet une sorte de filet dont les mailles retardent les molécules de taille élevée. Il est possible de choisir la taille des mailles en faisant varier de degré de polymérisation du gel.

Les gels de polyacrylamide que nous utilisons sont de type "discontinus", formés: d'un gel d'empilement qui concentre l'échantillon et d'un gel de séparation des protéines.

### VIII.1. Préparation des gels.

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

#### Gel de séparation

	solution lourde	solution légère
solution "stock"	20 ml	9,3 ml
Tris HCl 2 M pH 8,8	8 ml	8 ml
TEMED	16,5 $\mu$ l	16,5 $\mu$ l
saccharose 40%	6 ml	-
H <sub>2</sub> O bidistillée	10 ml	26,7 ml
SDS 10%	0,4 ml	0,4 ml
Persulfate d'ammonium 10%(P/V)	0,1 ml	0,1 ml

#### Gel d'empilement

solution "stock"	8 ml
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	6 ml
TEMED	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidistillée	59 ml
SDS 10%	0,6 ml
Persulfate d'ammonium 10%(P/V)	0,4 ml

La polymérisation est amorcée par une réaction entre les TEMED et le persulfate d'ammonium. L'activation par le TEMED lui permet d'attaquer les doubles liaisons de l'acrylamide et du bis - acrylamide et de produire ainsi une réticulation dans les trois dimensions.

### VIII.2. Préparation des plaques de coulage des gels.

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre séparées par des espaceurs de 0,7 mm. d'épaisseur.

Les plaques sont soigneusement dégraissées avec de l'acétone avant l'assemblage; elles sont ensuite glissées dans un appareil PHARMACIA placé de niveau. Le gradient est réalisé en reprenant 38 ml de solution (légère et lourde) dans les deux compartiments du mélangeur, la solution légère devant être dans celui qui est proche de la sortie en veillant bien à ce que la communication entre les deux soit fermée.

Une fois les deux solutions versées dans leurs compartiments respectifs, la communication entre ceux-ci est ouverte, le mélangeur est mis en route et la vis de serrage proche des plaques est réglée afin d'obtenir un bon débit. Dès que les compartiments sont vides, ils sont remplis avec du glycérol 50% (V/V) coloré par du bleu de bromophénol. Son rôle est de pousser l'acrylamide resté dans le treillis, situé sous les plaques. Nous déposons quelques gouttes d'eau au-dessus du gel pour créer une surface plane, à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille longue et fine. Ce gel doit polymériser une heure au moins. Avant de verser le gel d'empilement au-dessus du gel de séparation, toute trace d'eau doit être éliminée. Les plaques sont remplies jusqu'au sommet avec ce second gel et nous plaçons les peignes qui détermineront des "puits" ( +/- 35  $\mu$ l ) où les échantillons seront déposés. Cette seconde polymérisation requiert douze heures.

### VIII.3. Electrophorèse et migration des protéines.

#### Composition du tampon d'électrophorèse.

Tris HCl	13,6 mg
glycocolle	65 gr
SDS 10% (P/V)	45 ml

Le tout est porté à 4,5 litres avec de l'eau bidistillée et le pH est ajusté à 8,3.

Avant de déposer les échantillons, nous réalisons une pré-électrophorèse en assurant une circulation continue du tampon et une réfrigération de la cuve. Nous réglons le courant sur 30 mA/ plaque.

Après une demi heure, nous coupons le courant pour déposer nos échantillons (volume maximum = 35  $\mu$ l) dans les puits prévus à cet effet. Le sommet des plaques est délicatement recouvert de tampon et le courant de 30 mA/plaque est rétabli.

#### VIII.4. Coloration des gels.

##### Composition des bains:

Fixation:	TCA	57 gr
	Acide sulfosalicylique	17 gr
	alcool méthylique	150 ml
	H <sub>2</sub> O bidistillée	350 ml
Coloration:	Bleu de Coomassie R 250	1,25 gr
	alcool méthylique	227 ml
	Acide acétique glacial	46 ml
	H <sub>2</sub> O bidistillée	328 ml
Décoloration:	Alcool éthylique	1.500 ml
	Acide acétique glacial	500 ml
	H <sub>2</sub> O bidistillée	3.000 ml.

Après électrophorèse, les gels sont démoulés et placés directement dans le bain de fixation pendant une heure. Ils sont ensuite transférés dans le bain colorant pendant deux heures et finalement, lavés plusieurs fois dans le bain de décoloration.

#### VIII. 5. Sèchage des gels.

Il se fait sous vide dans un appareil PHARMACIA prévu à cet effet. Le gel doit être placé sur un papier filtre humide en évitant toute bulle d'air et peut être recouvert par un papier cellophane également humidifié.

Le sèchage peut être accéléré en disposant une source de chaleur au-dessus de l'appareil.

#### IX . Autoradiographie.

Elles sont réalisées sur des gels plats. Les techniques de préparation, de coulage et d'électrophorèse viennent d'être décrites. Seul le bain de fixation est modifié; sa composition est la suivante:

TCA 100 %	10 ml
Acide acétique glacial	10 ml
Alcool méthylique	30 ml
H <sub>2</sub> O bidistillée	50 ml

La fixation dure une heure. Le gel est ensuite placé pendant une heure trente dans un bain de méthanol 50 %, ce qui permet un séchage plus rapide. On l'immerge alors dans du Enlightning contenant un liquide scintillant et un fixateur (New England Nuclear) pendant vingt minutes. Cette étape est également suivie d'un séchage. Le gel est alors mis en contact avec un film radiographique XAR - 5 dans une cassette Kodak X - Omatic prévue à cet effet. L'exposition se fait à - 80°C. Le temps d'exposition est à déterminer selon la quantité de matériel radioactif déposé sur le gel. Après exposition et que le film soit revenu à température ambiante, il est révélé en chambre noire.

Développement:

Révélation	- 5 minutes
Bain d'arrêt (H <sub>2</sub> O)	- 3 minutes
Fixateur	- 3 minutes

La plaque est abondamment rincée à l'eau avant d'être séchée.

## DOSAGES.

I. Dosage des protéines.Principe:

La méthode utilisée dérive de celle décrite par LOWRY (1955). Les protéines dénaturées par l'action du Na OH sont mises en présence d'une faible quantité de cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ) en milieu alcalin additionné de tartrate sodicopotassique de manière à le garder en suspension. De telles conditions permettent la formation d'un complexe  $\text{Cu}^{++}$  liaison peptidique.

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

Mode opératoire:

Le dosage se réalise sur 0,5 ml d'échantillon (étalon ou test dilué de façon adéquate). On ajoute à chaque tube 0,5 ml de Na OH 1N. Après trente minutes à température ambiante on ajoute 5 ml d'une mixture composée de 100 volumes de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, pour 1 volume de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% et 1 volume de  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2%.

Elle doit être préparée extemporanément vu l'instabilité de la suspension cuivrique. Après exactement quinze minutes on met dans chaque tube 0,25 ml de réactif de Folin - Ciocalteu. Après trente minutes de réaction, les extinctions sont lues au spectrophomètre à 660 nm. L'étalonnage est réalisé à partir de concentrations connues et croissantes en SAB. La relation entre les extinctions et les concentrations en protéines est linéaire pour des quantités en SAB comprises entre 0 et 100  $\mu\text{g}$ .

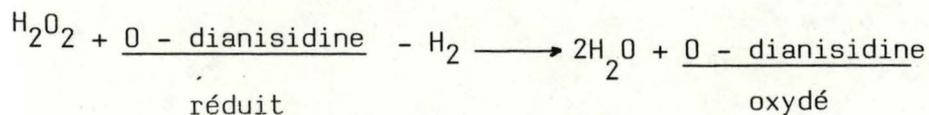
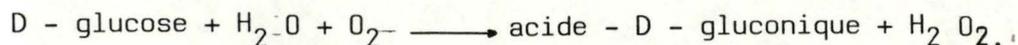
II. Dosage du glucose dans l'hémolymphe.

La déprotéinisation de ce milieu est une étape préliminaire indispensable pour le dosage du glucose par colorimétrie. En effet, les protéines provoquent une turbidité gênant les lectures photométriques. Elles peuvent également interférer directement avec la réaction chromogène.

La déprotéinisation est réalisée par l'addition successive de sulfate de zinc puis de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  qui provoque la précipitation des protéines. Le rapport des deux substances doit être tel que le pH soit égal à 7,0 et doit être suffisant pour précipiter toutes les protéines.

#### Dosage du glucose.

En milieu aqueux, la glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du D - Glucose en acide D - gluconique. Le peroxyde d'hydrogène formé lors de cette réaction oxyde, et ce, en présence de peroxydase (POD), une substance qui à l'état oxydé présente un maximum d'absorbance à 420 nm.



#### Mode opératoire:

Le dosage se réalise sur 0,5 ml d'hémolymphe déprotéinée. A chaque tube on ajoute 50  $\mu\text{l}$  d'O - dianisidine (3 mg/ml) et 2,5 ml d'une solution de composition suivante:

Tampon Tris 1M pH 8,0:	2,5 ml
glucose oxydase	: 25 mg
péroxydase	: 5 mg

le tout porté à un volume de 100 ml avec de l'eau bidistillée. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant une heure et l'extinction résultant de leur coloration est mesurée à 420 nm.

L'étalonnage se fait avec une solution de glucose de concentration connue et croissante. L'extinction est proportionnelle à la quantité de D - glucose tant que celle-ci ne dépasse pas 40  $\mu\text{g}$ .

RESULTATS.

I, II, III.: EXPERIENCES "IN VITRO".

1, 2, 3 : EXPERIENCES "IN VIVO".

## I. Vérification des conditions expérimentales.

### I.1. Le système de référence.

Un milieu permettant de mesurer les phosphorylations a été défini par Rudolph & Krueger (1979) en ce qui concerne les systèmes de vertébrés. Nous avons repris les conditions initiales dans cette méthode. La première démarche a été de vérifier si un système commercial performant, constitué de protamine sulfate en tant que substrat et de protéine kinase de coeur de boeuf comme enzyme peut fonctionner.

Le milieu utilisé contient du tampon Pipès 200 mM, un inhibiteur de phosphodiésterases de l'IBMX mM, un inhibiteur de phosphatases et d'ATPases du NaF 50 mM, du  $Mg\ Cl_2$  10 mM, 0,2 mg de protéine kinase purifiée et 0,1mg de protamine sulfate. La réaction est amorcée par l'addition de  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$  à concentration finale  $10\ \mu M$  ( 500 cpm/picomole). L'incubation se fait à température ambiante. Des blancs sont réalisés comme indiqué au point III de "matériel et méthodes", et leur valeur, assez constante, est retirée de celles obtenues pour les tests.

Dans ces mêmes conditions, nous mesurons l'effet de l'EDTA (mM) et de l'AMP cyclique ( $100\ \mu M$ ).

L'autophosphorylation de la protéine kinase, pour les trois conditions précitées, est mesurée dans le milieu dépourvu de substrat.

Les résultats sont exprimés en pmoles de  $^{32}P$  incorporées /1/mg de protéine kinase purifiée.

T. d'incubation 10 min.	Phosphorylation du système exogène	Autophosphorylation de la protéine kinase	Phosphorylation du substrat.
Conditions normales	91	31	60
En présence d'AMPc	130	43,5	86,5
En présence d'EDTA	32	33	0

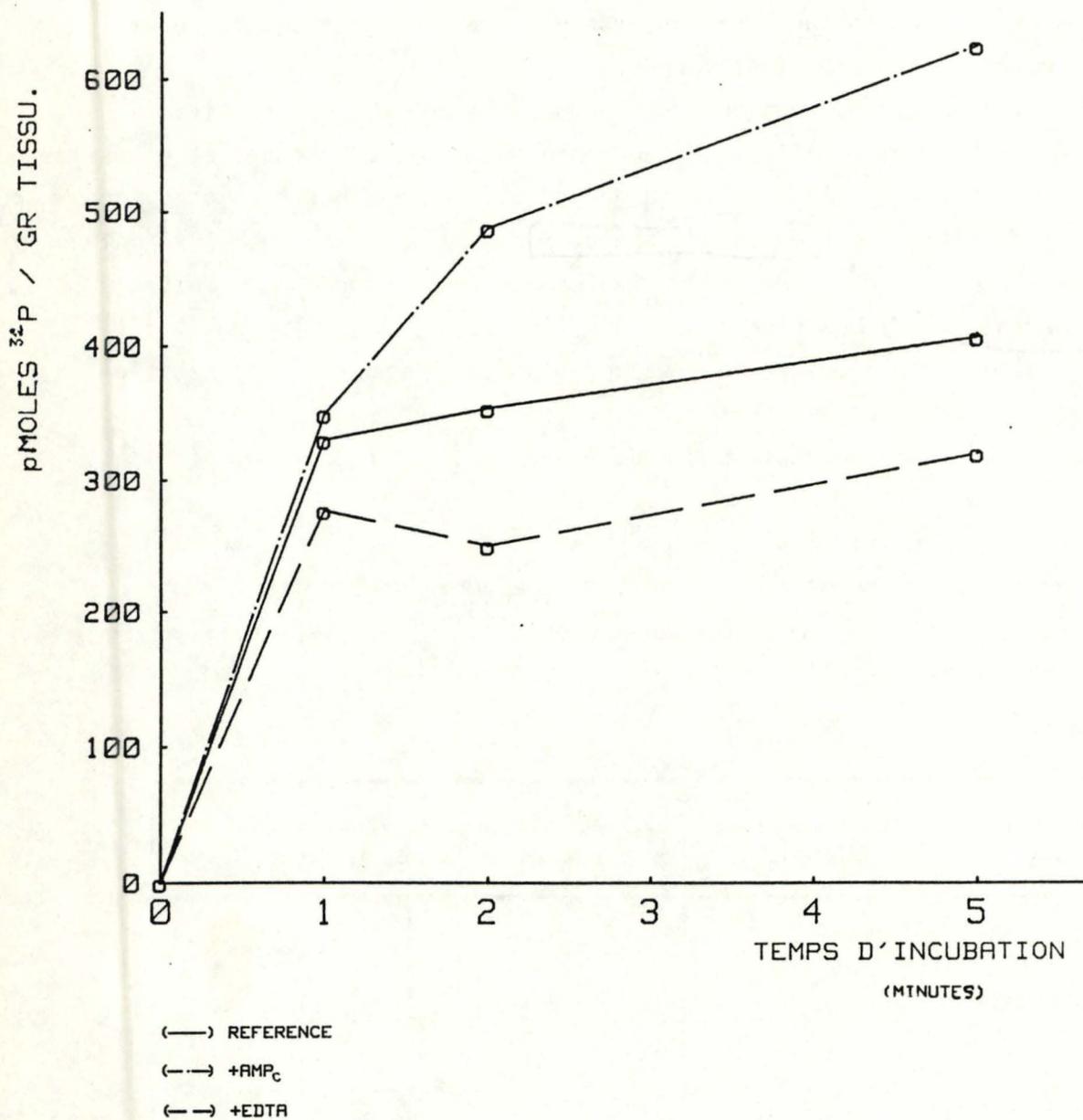


Figure I.2.a Evolution de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les protéines d'hépatopancreas de crabe en fonction du temps. Effet de l'AMP<sub>c</sub> et de l'EDTA.

## I.2. L'homogénat d'hépatopancréas de crabe.

Afin de nous assurer de la validité de la méthode décrite au § précédent, lorsqu'elle est appliquée pour la mesure des phosphorylations endogènes sur homogénat de tissu, nous avons testé l'hépatopancréas d'un autre crustacé que celui étudié ici, le crabe.

On a ajouté ~~de~~ l'homogénat de crabe, un inhibiteur de protéases le PMSF (mM).

Les résultats présentés au tableau I.2.1 et à la figure I.2.a sont exprimés en pmoles de  $^{32}$  P incorporées / gr de tissu.

Temps d'incubation	Conditions normales	En présence d'EDTA	En présence d'AMPc
1 min	331	277	350
2 min	354	250	488
5 min	407	320	625

Tableau I.2.1.

Tant dans le système commercial que dans l'homogénat d'hépatopancréas du crabe, nous observons une incorporation de la radioactivité dans la fraction protéique fixée sur papier (cf "Techniques" § III).

L'EDTA la diminue; elle est complètement inhibée dans le système commercial.

L'AMP cyclique stimule cette incorporation.

Lorsqu'on mesure les phosphorylations endogènes, il n'est pas possible d'en mesurer et soustraire l'autophosphorylation.

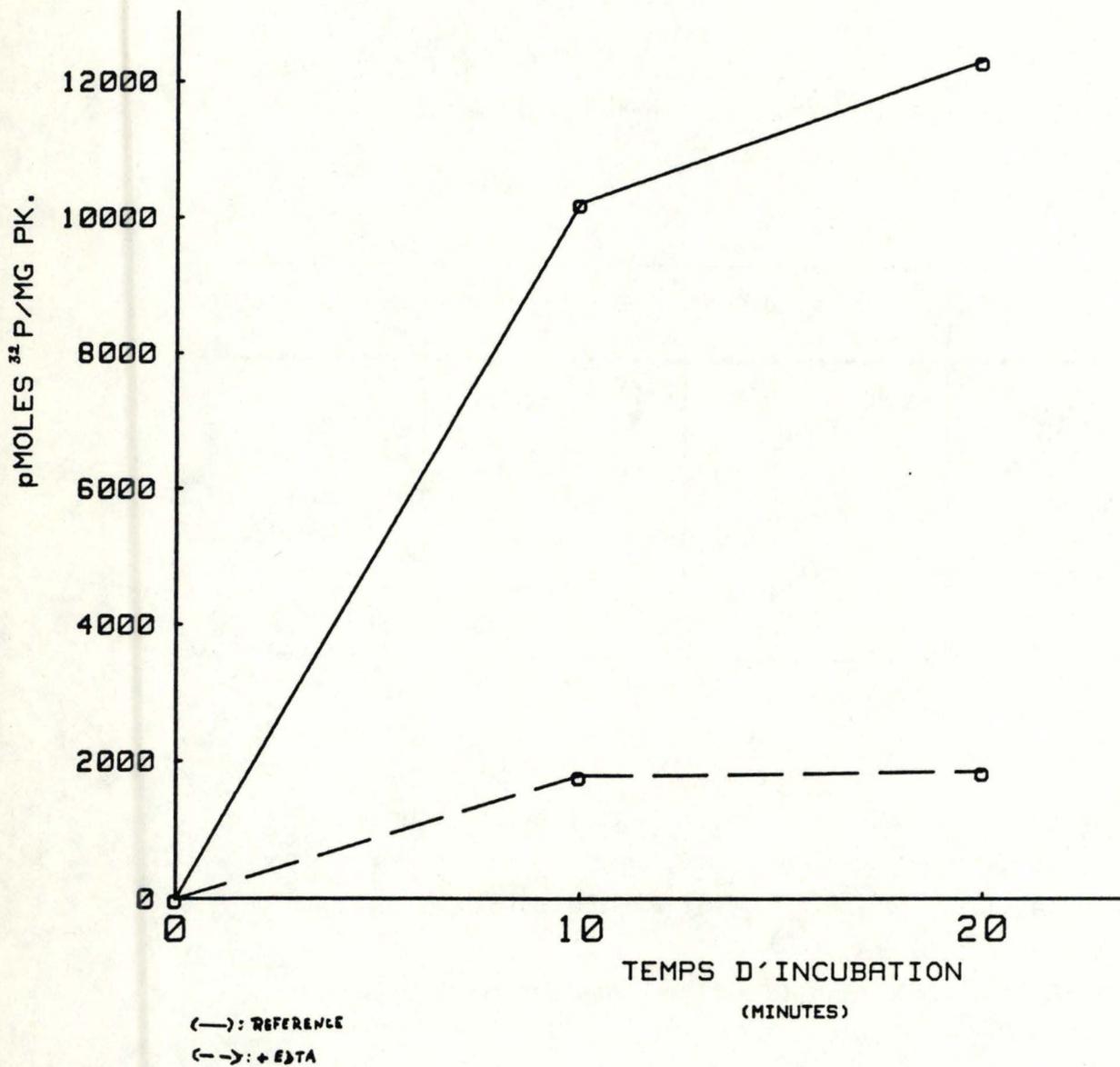


Figure II.1.a. Evolution de l'incorporation du <sup>32</sup>P dans les protéines d'hépatopancréas de homard en fonction du temps. Effet de l'EDTA.

## II. Phosphorylations dans l'hépatopancreas de homard.

### II. 1. Effet de l'EDTA.

L'homogénat est réalisé comme expliqué dans " matériel et méthode" et nous cherchons à mesurer les phosphorylations en utilisant les mêmes conditions initiales que celles du système expérimental de référence, développées au § I. La concentration en ATP est également 10  $\mu$ M.

Nous testons l'effet de l'EDTA à concentration finale mM.

Les résultats présentés au tableau II. 1.1. et à la figure II.1.a sont exprimés en pmoles de  $^{32}$  P incorporées / gr de tissu.

Temps d'incubation	Contrôle	Avec EDTA
10 min	10.205	1.777
20 min	12.286	1.840

Tableau II. 1.1.

On peut remarquer une incorporation de  $^{32}$  P dans la fraction protéique fixée sur papier. Elle est fortement inhibée (d'un facteur 10) par l'EDTA.

Le problème de la non - linéarité du test sera abordée dans la discussion.

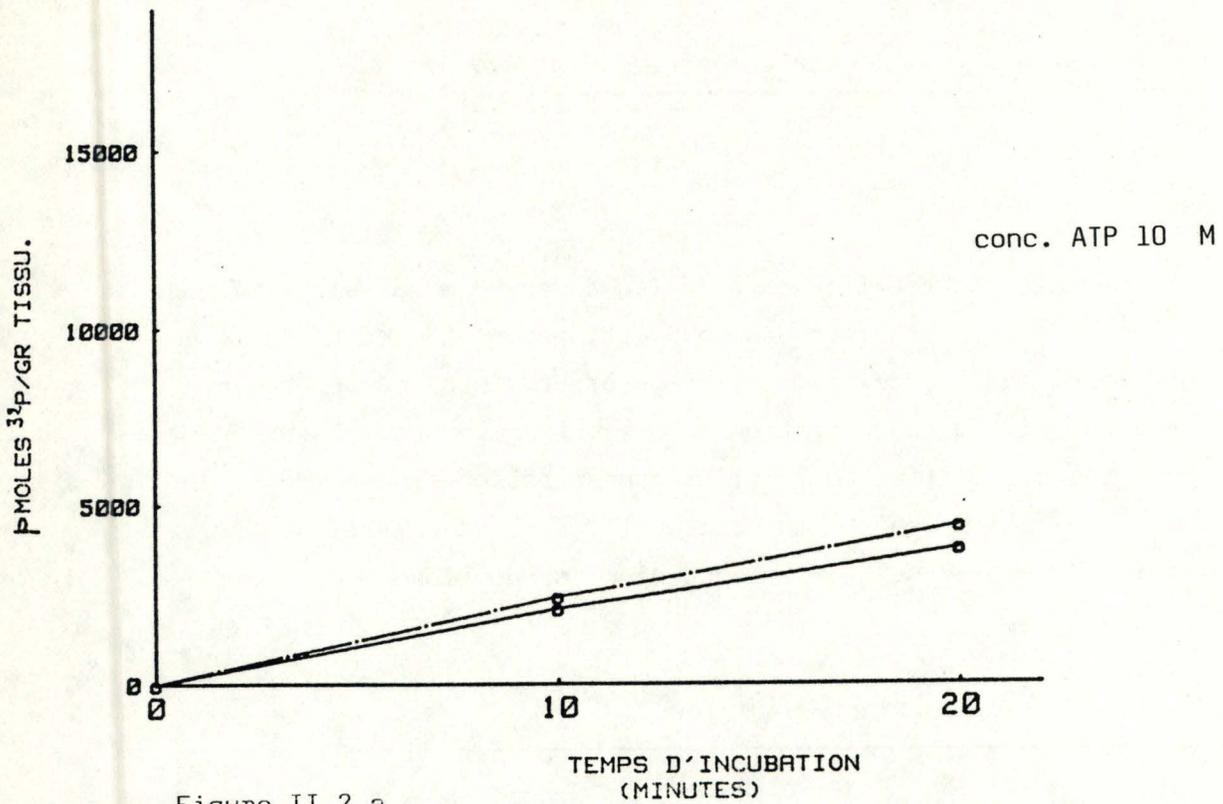


Figure II.2.a.

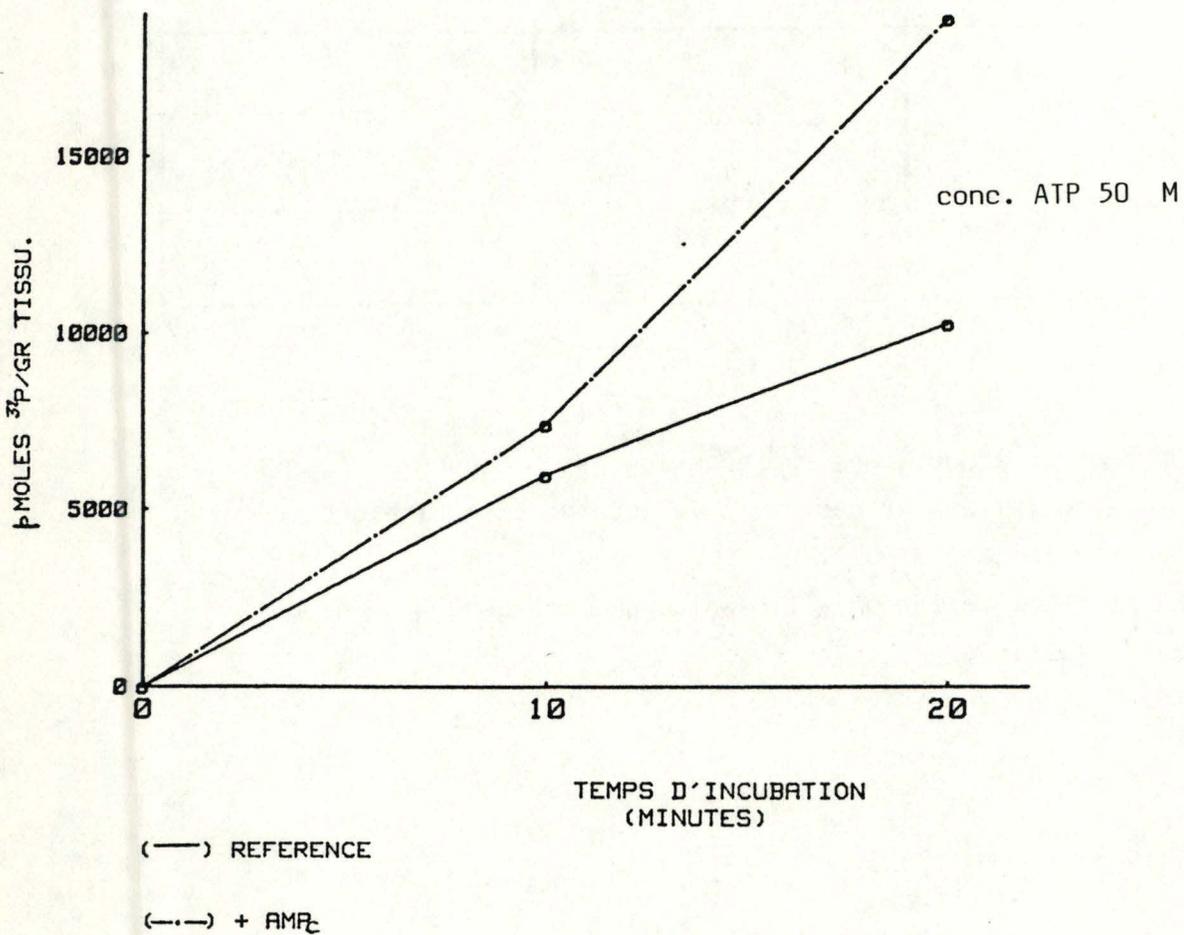


Figure II.2.b. Evolution de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les protéines de l'hépatopancréas en fonction du temps.

II.2. Effets de l'AMP cyclique et de la concentration en ATP.

On ajoute au milieu de départ de l'ALP cyclique à concentration finale 100  $\mu$ M. Pour le tableau II.2.1 et la figure II.2.a, la concentration en ATP est de 10  $\mu$ M; pour le tableau II.2.2 et la figure II.2.b, elle est de 50  $\mu$ M. Les blancs ont été soustraits des valeurs test. Les résultats sont exprimés en pmoles de  $^{32}$ P incorporées/ gr de tissu.

Temps d'incubation	Contrôle	Avec AMPc
10 min	2.113	2.441
20 min	3.806	4.442

Tableau II.2.1.

Temps d'incubation	Contrôle	Avec AMPc
10 min	5.970	7.373
20 min	10.302	18.892

Tableau II.2.2.

L'augmentation des phosphorylations mesurées par l'incorporation du  $^{32}$ P correspond assez bien à celle de l'ATP.

Pour les deux concentrations en ATP, nous observons une stimulation d'un facteur compris entre 1,5 & 2 par l'AMPc.

Différentes expériences ont été ensuite réalisées sur homogénat d'autres organes (branchies, coeur, muscle) et de l'hépatopancreas.

Nous observons dans tous les cas une incorporation de  $^{32}$ P; mais elle n'est pas proportionnelle au temps d'incubation.

### III. Présence d'un inhibiteur dans l'homogénat d'hépatopancreas.

---

#### III. 1. Stabilité du système de référence.

Suite à ces nombreux échecs, nous avons analysé la stabilité de notre système en fonction du temps. Le test présenté au tableau III. 1.1. est réalisé en utilisant la protéine kinase purifiée et la protamine sulfate dans les conditions prédéfinies au point I. 1.

Nous ajoutons de l'AMP cyclique (100  $\mu$ M) afin de stimuler la dissociation de la protéine kinase et espérons nous trouver dans les conditions optimales.

Temps d'incubation	pmoles $^{32}$ P/I'/mg PK
30 sec	3.937
1 min	3.395
2 min	3.379
5 min	2.400
10 min	1.935

TABLEAU III. 1. 1.

L'activité de la protéine kinase semble donc maximale endéans trente secondes; elle diminue de moitié après dix minutes d'incubation.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de ne laisser agir l'enzyme que pendant des temps ne dépassant pas cinq minutes.

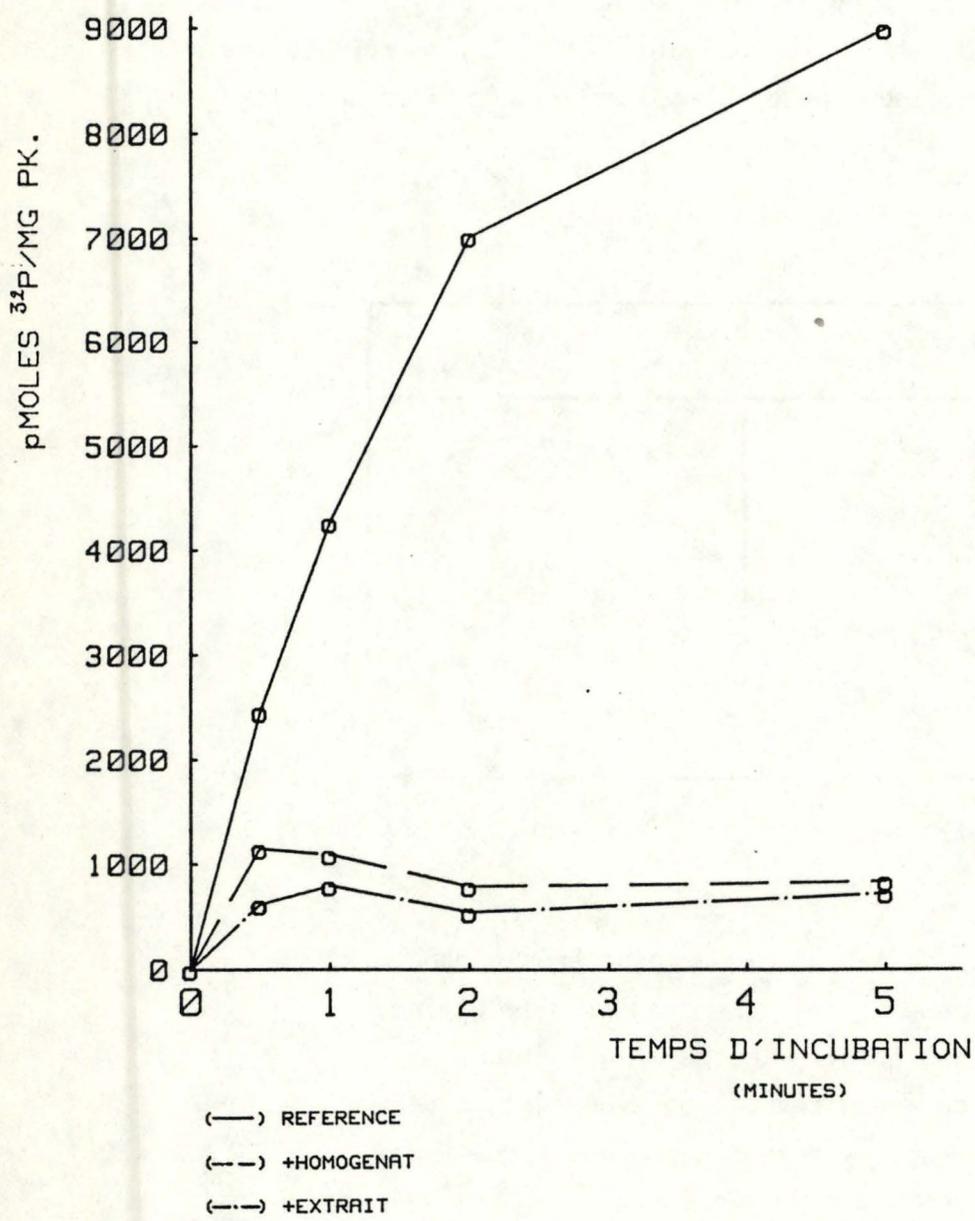


Figure III.2.a. Evolution de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  sur la protamine sulfate par la protéine kinase exogène, en présence d'homogénat ou d'extrait d'hépatopancréas de homard.

III. 2. Inhibition des phosphorylations du système commercial par l'homogénat d'hépatopancréas de homard.

Même en travaillant sur notre système pendant des temps d'incubation très courts, nous n'avons observé que rarement une relation linéaire entre l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les protéines et le temps d'incubation. Etant donné cela, nous pensons que nos difficultés à obtenir des phosphorylations sont totalement liées à l'homogénat lui-même et non au milieu utilisé pour les mesurer.

Ainsi, nous avons étudié le comportement du système de référence en présence d'homogénat ou d'extrait réalisé à basse vitesse (1.500 g). De l'AMP cyclique était présent dans le milieu afin de mieux détecter toute variation du système de référence.

L'activité propre de l'homogénat ou de l'extrait a été soustraite des résultats pour ne tenir compte que du système de référence.

Les résultats présentés au tableau III. 2. 1. et à la figure III. 2.a. sont exprimés en pmoles  $^{32}\text{P}$  incorporées/ mg de protéine kinase purifiée.

Temps d'incubation	Système de référence	+ 200 $\mu\text{l}$ d'homogénat	+ 200 $\mu\text{l}$ d'extrait basse vitesse
30 sec	2.454	1.150	619
1 min	4.270	1.093	799
2 min	7.016	786	542
5 min	8.985	835	720

Tableau III. 2. 1.

Le système de référence, mis en présence de 200  $\mu\text{l}$  d'homogénat ou d'extrait est inhibé. Dans le cas de l'homogénat, l'inhibition augmente avec le temps d'incubation. De plus petites quantités d'homogénat, ajoutées au système de référence, produisent une inhibition comparable.

Pour l'extrait, nous observons également une diminution dans l'incorporation du  $^{32}\text{P}$ . Au départ, celle-ci est plus élevée que pour l'homogénat mais par après elle se maintient à un niveau comparable à ce que l'on observe pour celui-ci.

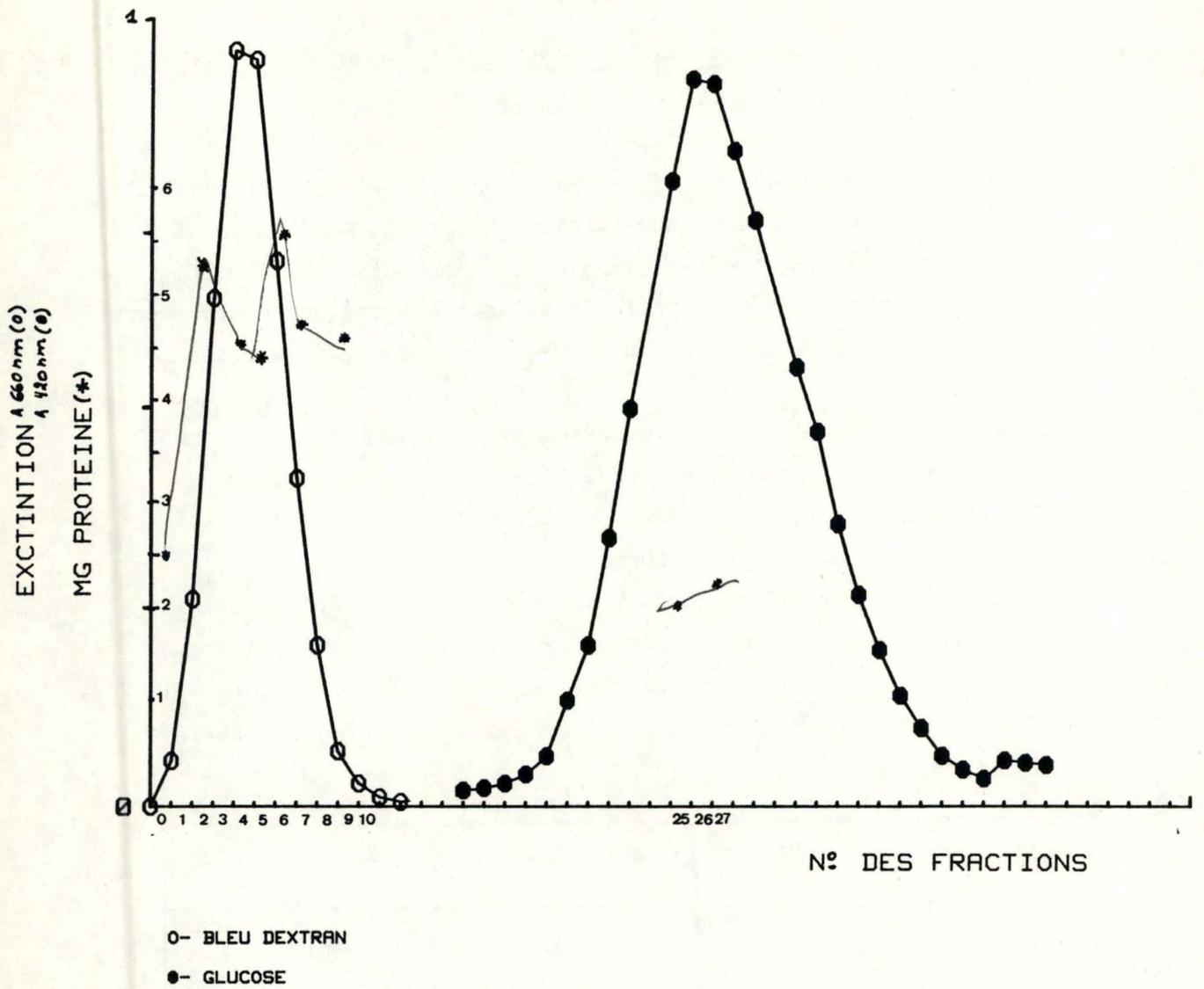


Figure III.3.1.a. Profil d'élution de la chromatographie sur tamis moléculaire (Séphadex G 25).

### III. 3. Essai d'isolement de l'inhibiteur par chromatographie sur tamis moléculaire.

Nous avons tenté de séparer l'activité protéine kinase ( la sous-unité C) d'un inhibiteur signalé dans la littérature par Donnelly (1973).

#### III. 3.1. Calibrage de la colonne.

Nous avons calibré la colonne de séphadex G 25 en déposant sur le gel une solution (1 ml) de bleu dextran (P M  $2,10^6$ ) et de glucose (P M = 198,17). Le profil d'élution est suivi par la lecture spectrophotométrique à 660 nm pour la substance de haut poids moléculaire et à 420 nm après mise en évidence du glucose selon la méthode décrite dans "Dosages" § II.

La colonne a un volume mort de 5,2 ml. Le profil obtenu est repris dans la figure III. 3.1.a.

#### III.3.2. Chromatographie d'un extrait d'hépatopancréas.

1 ml d'homogénat, préalablement débarrassé des lipides est déposé au sommet de la colonne. Il est élué par du tampon Pipes de même concentration auquel on a ajouté du PMSF mM final. L'éluat est récolté par fractions de 0,5 ml.

- a) Un dosage de protéines, selon la méthode reprise dans "Dosages" § I, a été réalisé sur certaines d'entre elles.
- b) Les fractions de haut poids moléculaire, notées de 1 à 8 inclu et une fraction de petit poids moléculaire (notée 26) ont été testées sur le système de référence en présence d'AMPc. Nous mesurons simultanément les phosphorylations de la fraction seule en présence d'AMPc. Ces valeurs sont retranchées de celles obtenues avec la référence afin de ne tenir compte que de lui.

Le tableau III. 3. 2.1. représente l'action des différentes fractions sélectionnées sur le système de référence; 50  $\mu$ l

de chacune lui ont été ajoutées. Les résultats sont exprimés en pmoles de  $^{32}$ P incorporées/mg de protéine kinase purifiée.

f 20 tent

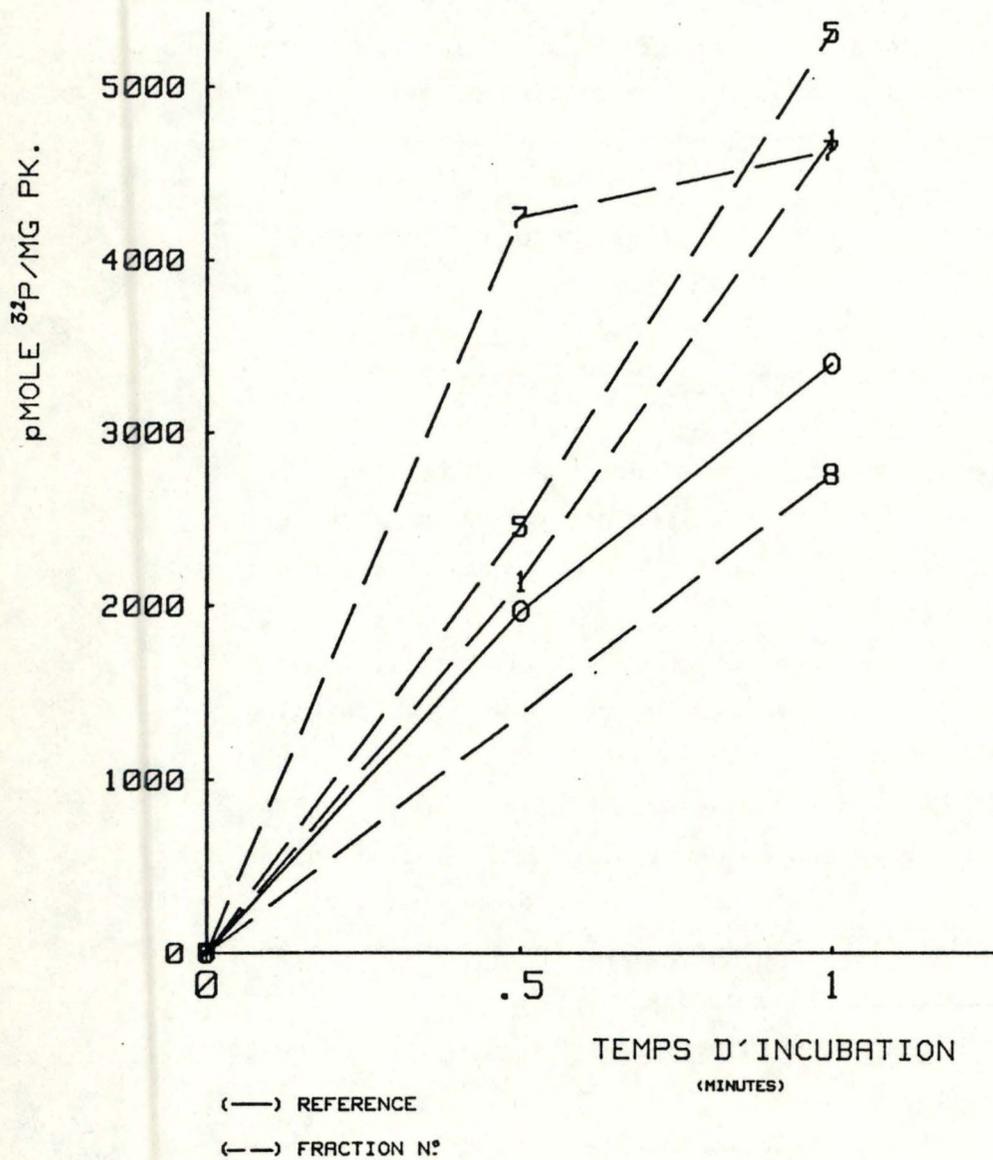


Figure III.3.2.a. Evolution de l'incorporation du <sup>32</sup>P sur la protamine sulfate par la protéine kinase exogène en présence de différentes fractions (non) inhibitrices obtenues par chromatographie (Séphadex G 25).

Temps d'incubation	30 sec	1 min	2 min	5 min
système de référence	1.696	3.395	6.758	12.000
+ Fraction I	2.139	4.694	9.640	7.725
+ Fraction 2	614	2.369	2.864	4.208
+ fraction 3	1.111	1.037	1.028	539
+ Fraction 4	0	804	539	1.726
+ fraction 5	2.459	5.317	6.031	10.248
+ Fraction 6	2.797	440	1.615	6.125
+ Fraction 7	4.249	4.632	6.358	10.531
+ Fraction 8	0	2.761	5.538	10.651
+ Fraction 26	1.706	2.230	11.096	23.187

Tableau III. 3. 2.1.

La figure III. 3. 2. a. reprend le système de référence seul ou mis en présence de fractions non-inhibitrices.

La figure III. 3. 2.b. reprend le système de référence seul ou mis en présence de fractions inhibitrices.

La figure III. 3. 2.c. reprend le système de référence seul et mis en présence d'une fraction de petit poids moléculaire.

Nous pouvons voir que certaines fonctions ne sont pas inhibitrices, d'autres le sont nettement et une fraction de petit poids moléculaire est même activatrice de phosphorylations. L'inhibition atteint son maximum pour les fractions 3 & 4.

*Non Activ!*

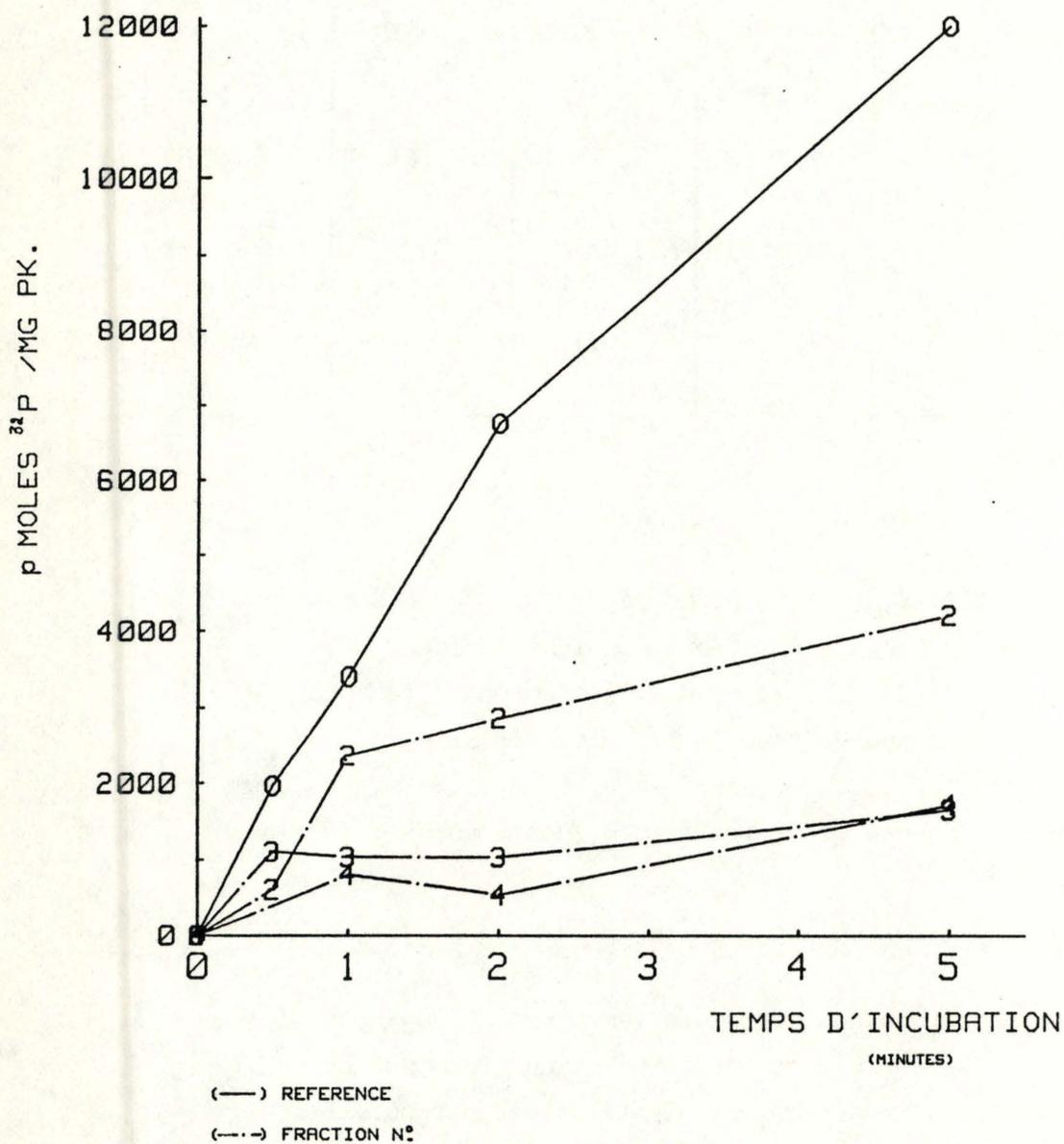


Figure III. 3.2.b. Evolution de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  sur la protamine sulfate par la protéine kinase exogène en présence de fractions inhibitrices obtenues par chromatographie. (Séphadex G 25).

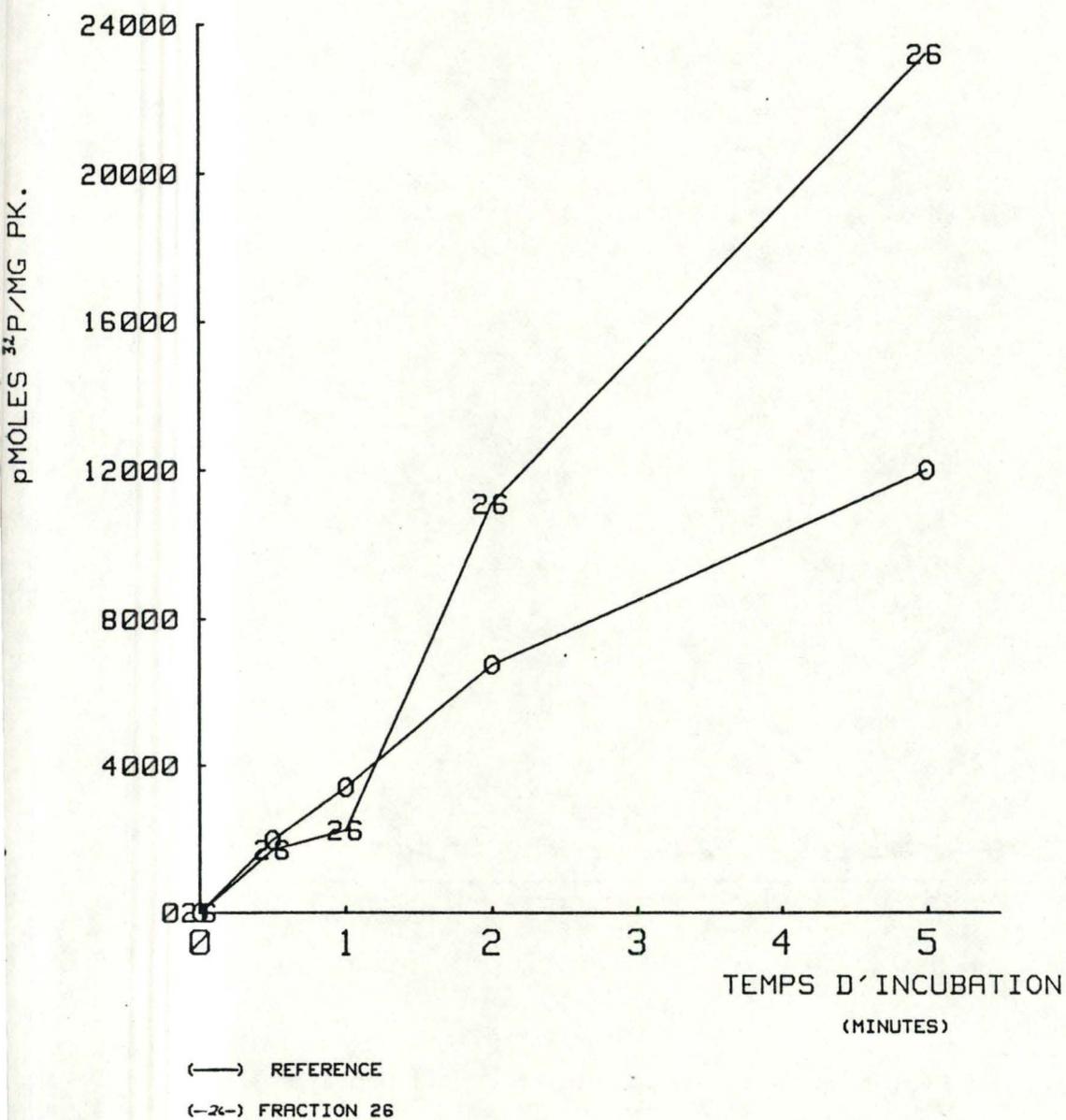


Figure III.3.2.c. Evolution de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  sur la protamine sulfate par la protéine kinase exogène en présence d'une fraction de petit PM obtenue par chromatographie (Séphadex G 25).

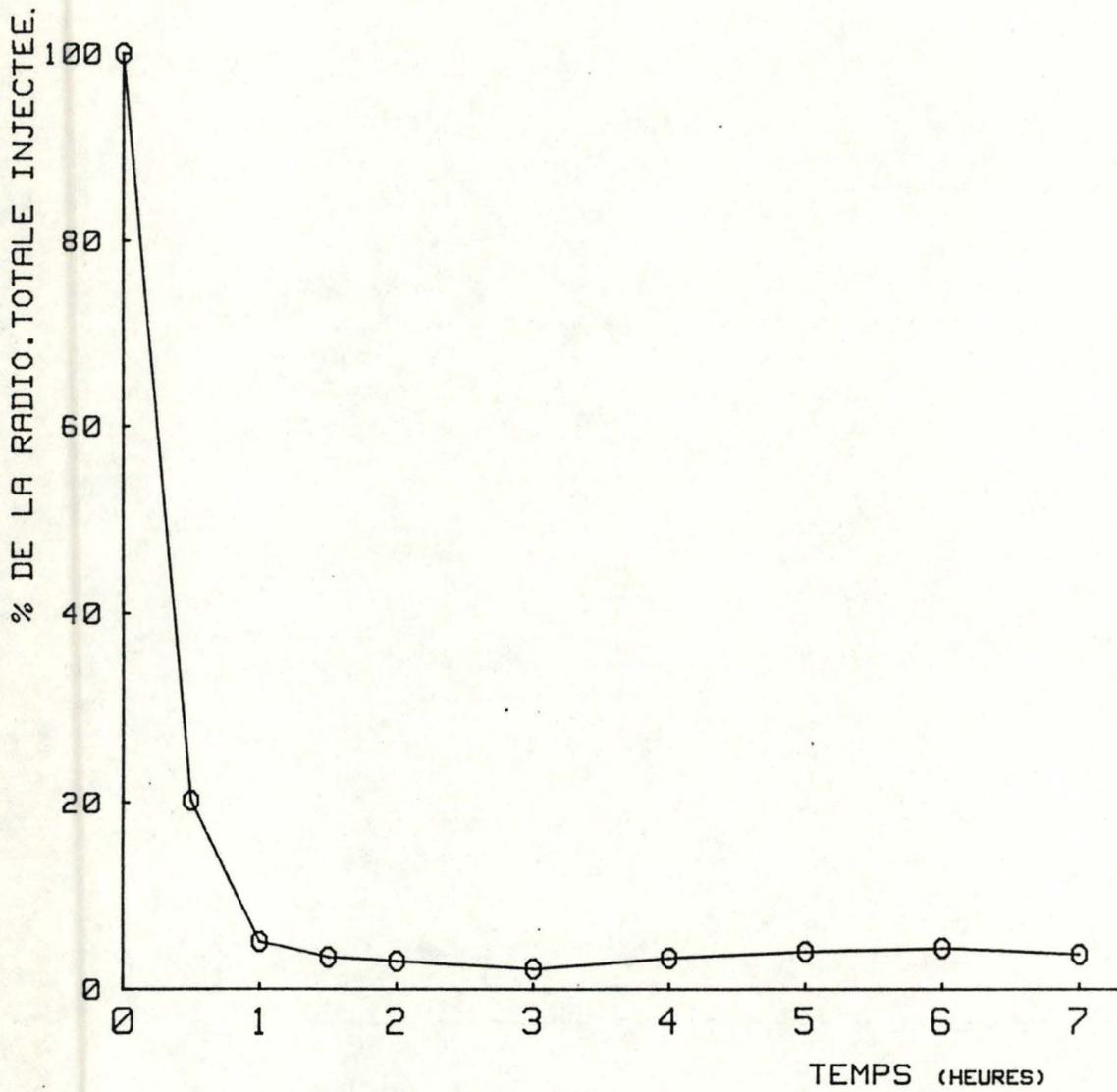


Figure 1.1.a. Evolution de la radioactivité dans l'hémolymphe d'un individu normal.

L'étude des phosphorylations in vivo est rendue possible par l'injection de  $^{32}\text{P NaH}_2\text{PO}_4$  dans les conditions définies au § IV. du chapitre "Techniques".

Plusieurs paramètres sont mesurés: la disparition du marqueur dans l'hémolymphe, son rejet dans le milieu extérieur, sa capture dans certains organes et son incorporation dans leurs protéines.

Plusieurs conditions sont retenues, un individu normal, un homard épédonculé injecté d'une fraction hyperglycémiant (F.7) et un individu normal également injecté de F.7.

### 1. Etude des phosphorylations chez un individu normal.

L'animal utilisé pèse 518 gr. Nous l'avons placé dans 6,3 l d'eau de mer. Nous lui avons injecté 1 ml d'une solution de  $^{32}\text{P}$  correspondant à environ  $400 \cdot 10^6$  cpm.

#### 1.1. Cinétique de disparition du $[^{32}\text{P}] \text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Des prélèvements d'hémolymphe à intervalles réguliers nous ont permis de calculer les valeurs représentées au tableau 1.1.1. et qui ont servis de base pour établir la figure 1.1.a.

Les résultats y sont exprimés en pourcentage du maximum injecté.

Temps en heure	% du maximum injecté
0	100
$\frac{1}{2}$	20
1	5,04
$1\frac{1}{2}$	3,38
2	2,96
3	2,14
4	3,27
5	3,97
6	4,32
7	3,66

Tableau 1.1.1.

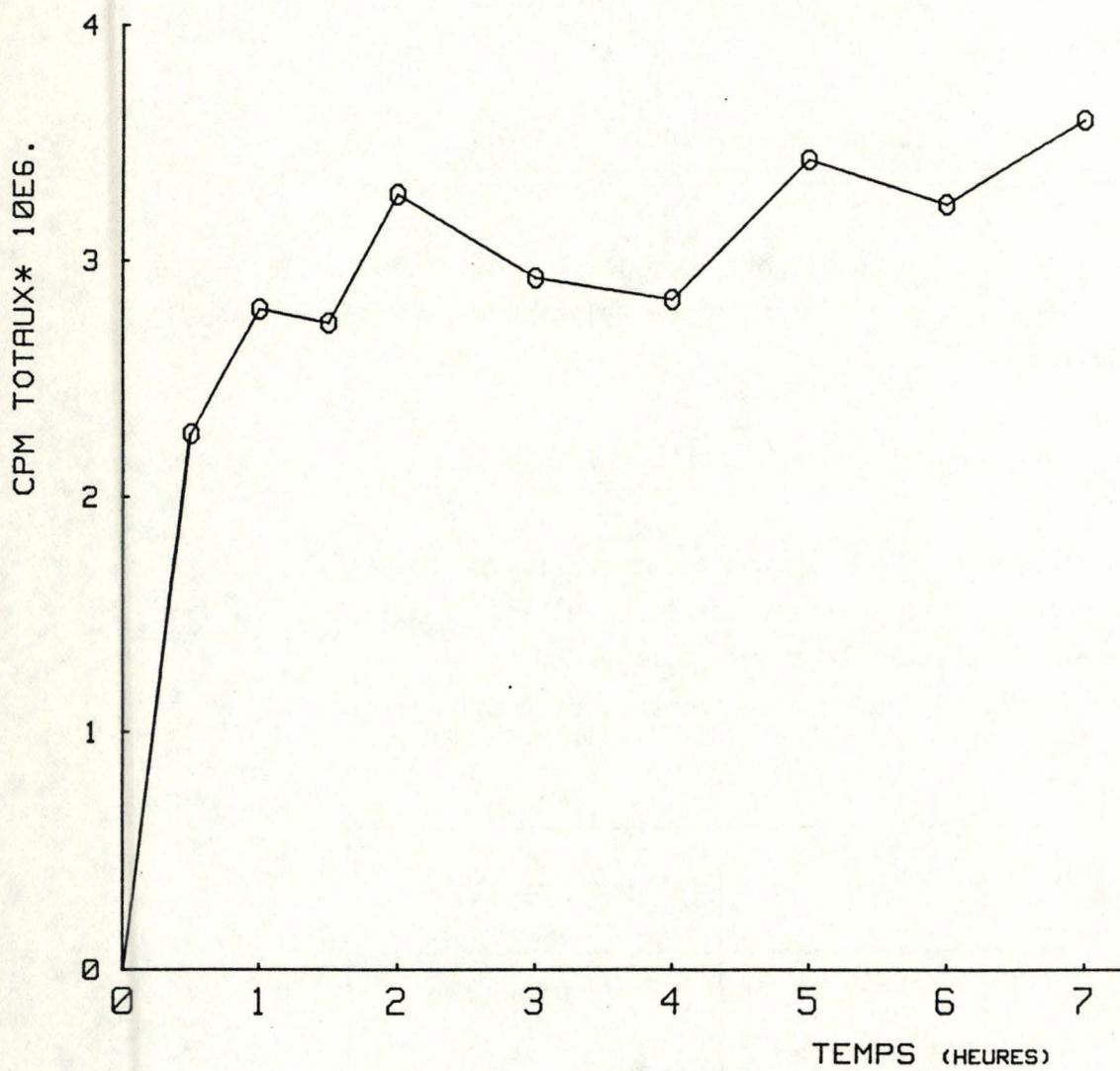


Figure 1.2.a. Evolution du rejet de la radioactivité dans l'eau de mer par un homard normal.

La résorption de l'isotope radioactif est très rapide dans la première heure suivant l'injection; ensuite sa vitesse se stabilise pour atteindre un plateau. Etant donné la rapidité avec laquelle le marqueur quitte l'hémolymphe, on pourrait penser à une "fuite" de matériel à l'extérieur. C'est pour cette raison que nous avons suivi parallèlement la radioactivité de l'eau de mer.

### 1. 2. Evolution de la radioactivité dans l'eau de mer.

Les résultats sont exprimés en cpm totaux, c'est-à-dire cpm pour la quantité totale d'eau.

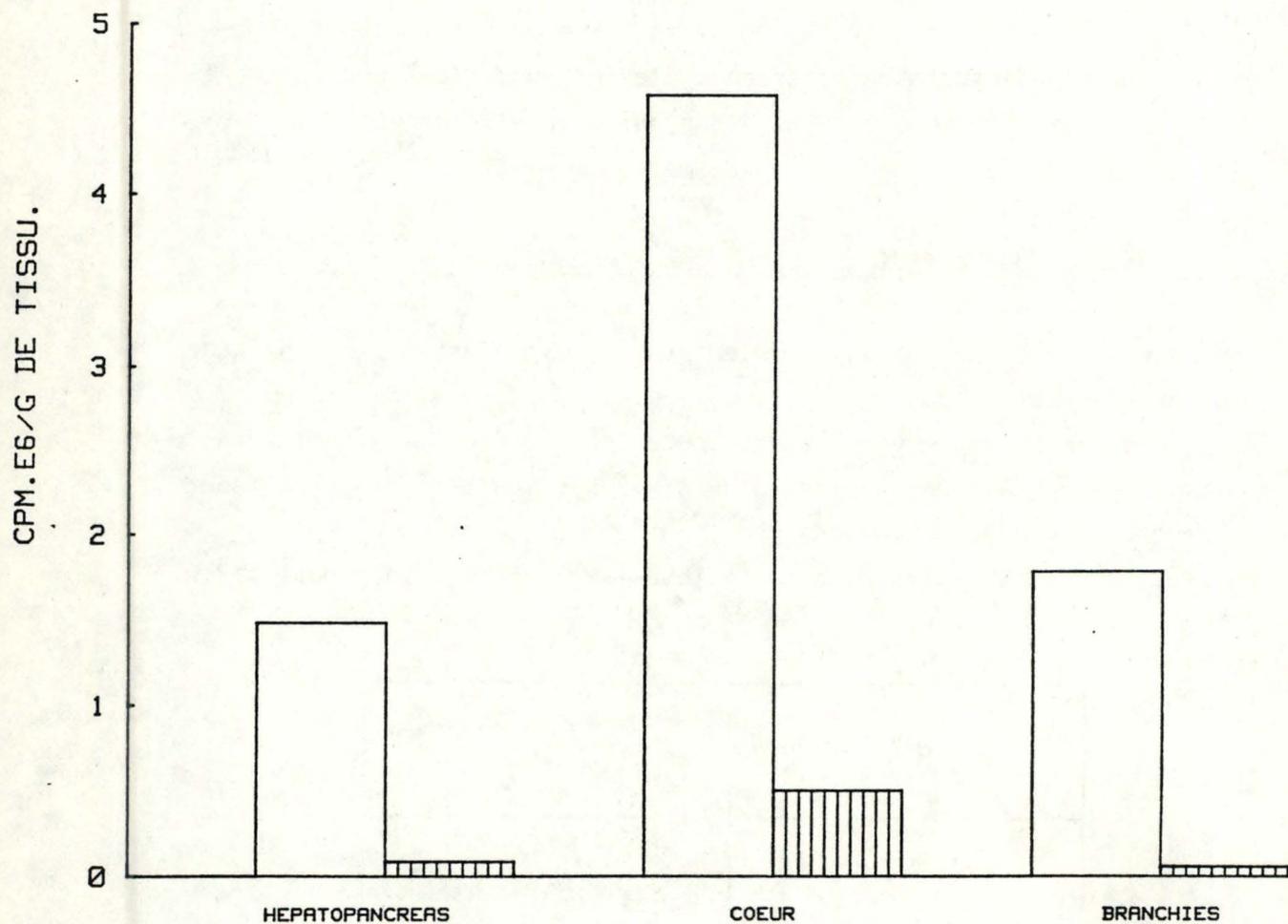
Une mesure au temps 0, avant toute introduction de matériel radioactif, est soustrait des autres valeurs; il sert de blanc qui représente le background propre à l'eau de mer.

Les résultats sont repris dans le tableau 1.2.1 et dans la figure 1.2.a.

Temps en heures	cpm totaux cumulatifs $\times 10^6$
$\frac{1}{2}$	2,27
1	2,80
$1\frac{1}{2}$	2,74
2	3,28
3	2,93
4	2,84
5	3,43
6	3,24
7	3,60

Tableau 1.2.1

Le rejet à l'extérieur est quasiment négligeable puisqu'il représente, après huit heures d'expériences, à peine 1% de ce qui a été injecté à l'animal.



(NON HACHURE) CAPTURE TOTALE DS L'ORGANE

(HACHURE) INCORPORATION DS LES PROTEINES

Figure 1.3.a. Capture totale et incorporation de la radioactivité dans les protéines de trois organes d'un individu normal.

### 1.3. Capture de la radioactivité dans les organes.

La diminution rapide de la radioactivité dans l'hémolymphe ainsi que la faible perte dans le milieu extérieur, laisse supposer qu'il existe un stockage du marqueur dans certains organes. Ainsi donc, après avoir sacrifié l'animal, nous lui prélevons trois organes cibles de l'hormone hyperglycémiant: le coeur, les branchies et l'hépatopancréas afin d'y mesurer la radioactivité totale captée par l'organe et celle précipitable au TCA.

Les résultats sont repris dans le tableau 1.3.1 et à la figure 13.a.

	Capture totale en cpm/gr de tissu	Incorporation dans les protéines en cpm/gr de tissu	en % du total
Hépatopancréas	1.481.250	82.747	6
Coeur	4.574.500	496.561	11
Branchies	1.782.500	54.844	3

Tableau 1.3.1.

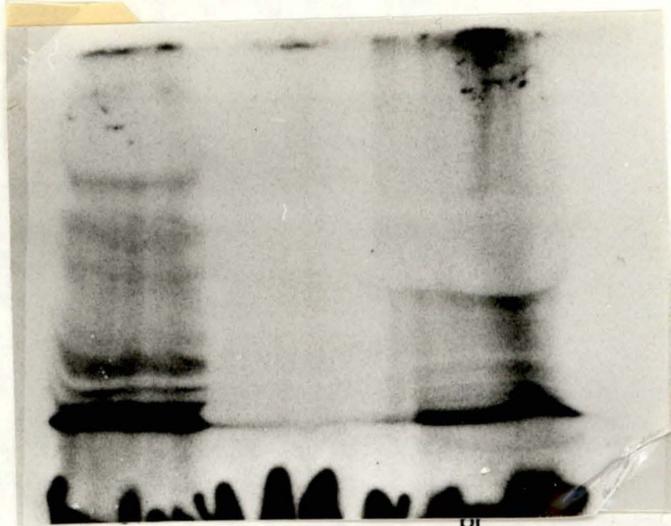
Nous observons une accumulation de radioactivité dans tous ces organes et principalement au niveau du coeur.

La même conclusion peut être formulée pour la fraction incorporée aux protéines.

### 1.4. Protéines circulantes.

A chaque prélèvement, nous traitons l'échantillon d'hémolymphe au TCA 10% pour déterminer la radioactivité incorporée dans la fraction protéique. Le background de l'hémolymphe est éliminé de nos valeurs en leur soustrayant le nombre de cpm obtenu avant toute injection de  $^{32}\text{P}$ .

Nous n'avons pas pu mettre en évidence des protéines phosphorylées circulantes.



Autoradiographie

### 1.5. Electrophorèse et autoradiographie.

Le culot obtenu par précipitation au TCA (cf § II.2 dans Techniques) est resuspendu dans un volume connu de tampon constitué de Tris-HCl 0,75 M, de saccharose 17%, de SDS 10% et de  $\beta$ -mercaptoéthanol 5% à pH 8,6. Nous déposons 30  $\mu$ l de cette préparation dans les puits situés à cet effet au sommet du gel. Les caractéristiques du culot d'un point de vue radioactivité sont reprises au tableau 1.5.1.

	cpm/gr de culot	cpm déposé sur le gel (dans 30 $\mu$ l)
Hépatopancréas	181.212	1.794
Coeur	965.455	9.558
Branchies	141.818	1.404

Tableau 1.5.1.

Les étalons employés dans l'électrophorèse sont:

	PM	Quantité déposée sur le gel
Phosphorylase b	94.000	12,8 $\mu$ gr
Ovalbumine	43.000	29,4 $\mu$ gr
Carbonic anhydrase	30.000	16,6 $\mu$ gr
Soybean Trypsin inhibitor	20.100	16 $\mu$ gr
$\alpha$ . Lactalbumine	14.400	24,2 $\mu$ gr

Tableau 1.5.2.

Pour pouvoir mettre en évidence par autoradiographie la phosphorylation de protéines, il nous fallait une quantité radioactive suffisante, ce qui nous a obligé à mettre un maximum de matériel sur l'électrophorèse. Les résultats obtenus par cette technique de séparation, tout en donnant une bonne indication de la distribution des protéines en fonction de leur P.M, ne sont pas techniquement présentables.

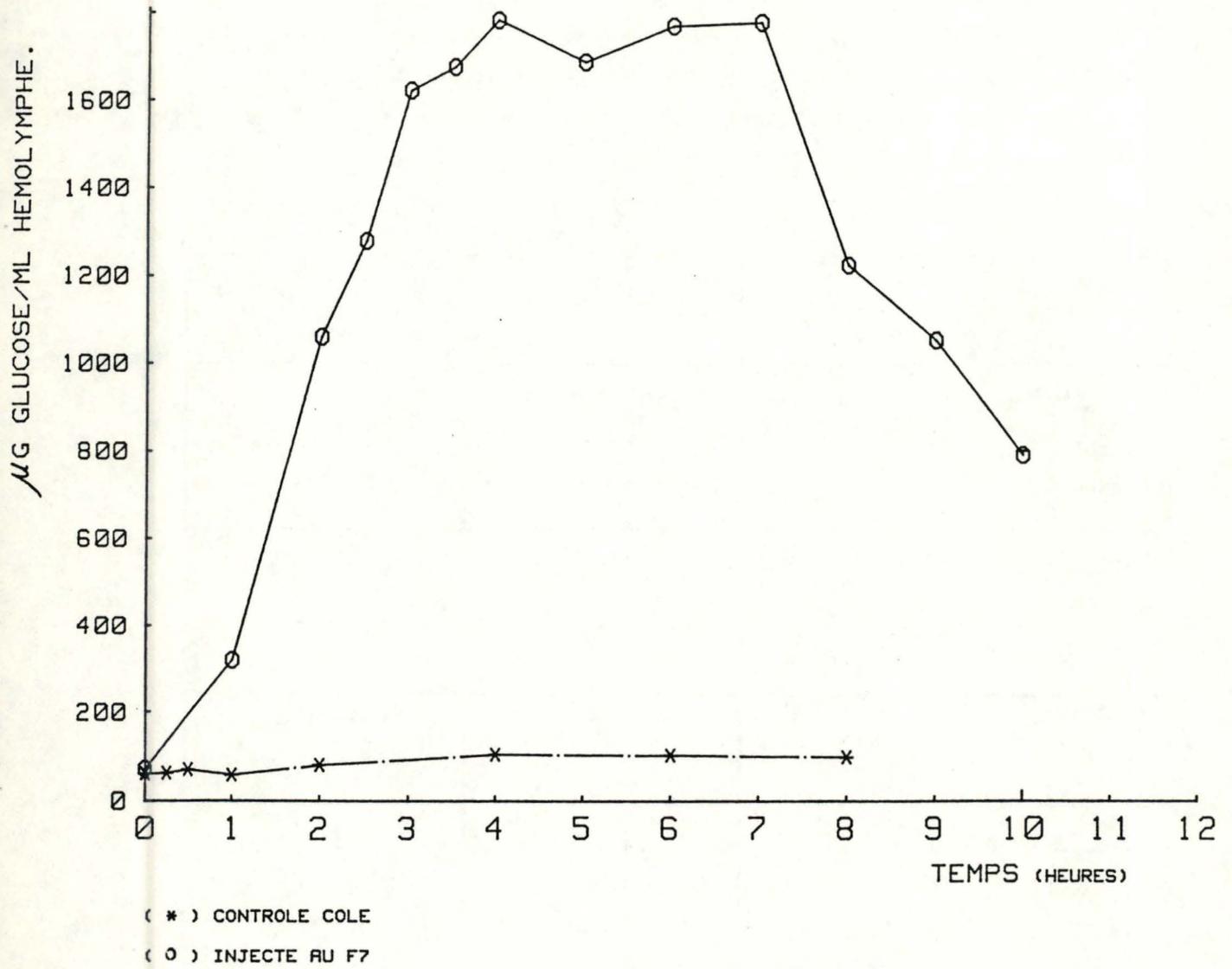


Figure 2.1.a. Evolution de la glycémie d'un homard épédonculé injecté d'une fraction hyperglycémiant (F.7).

La majorité des bandes qui apparaissent en autoradiographie correspondent à des molécules de petit poids moléculaire. On en dénombre une dizaine dans le coeur dont trois de P M supérieur à 95.000, deux comprises entre 95.000 et 43.000, trois comprises entre 43.000 et 30.000. Il est plus malaisé de les identifier dans les branchies .

Pour tous les cas, un ensemble d'oligopeptides se situe au niveau et même au-delà du front de migration.

## 2. Etude des phosphorylations chez un individu épédonculé, injecté à la fraction hyperglycémiant.

Un individu épédonculé depuis environ un mois et de 568 gr, placé dans 10,8 litres d'eau de mer, est injecté de l'équivalent d'un demi pédoncule oculaire de la fraction hyperglycémiant. Nous suivons l'évolution de la glycémie par dosage spécifique du glucose (cf § II dans "Dosages"). C'est seulement si l'individu manifeste une hyperglycémie dans les deux heures qui suivent, que nous lui injectons l'isotope radioactif. Pour le reste , nous procédons de manière identique à celle utilisée dans le cas du homard normal, si ce n'est que nous mesurons à chaque fois le glucose sanguin.

### 2.1. Evolution de la glycémie.

Le profil d'évolution de la glycémie est repris à la figure 2.1.a. Une heure après l'injection, l'hyperglycémie est manifeste. Après deux heures, le taux de glucose est plus de dix fois supérieur au taux initial. L'évolution de la glycémie d'un homard épédonculé et injecté à la solution de Cole est présenté sur le même graphique. L'hyperglycémie n'est donc pas la résultat d'un stress dû à la manipulation.

L'injection du  $^{32}\text{P}$  a été faite chez l'animal en hyperglycémie après deux heures. La glycémie de celui-ci atteint un plateau après trois heures d'expérience; elle s'y maintient pendant quatre heures et diminue ensuite. Le maximum atteint est de 1,8 mg de glucose/ml d'hémolymphe; il correspond à 22,5 fois le taux initial.

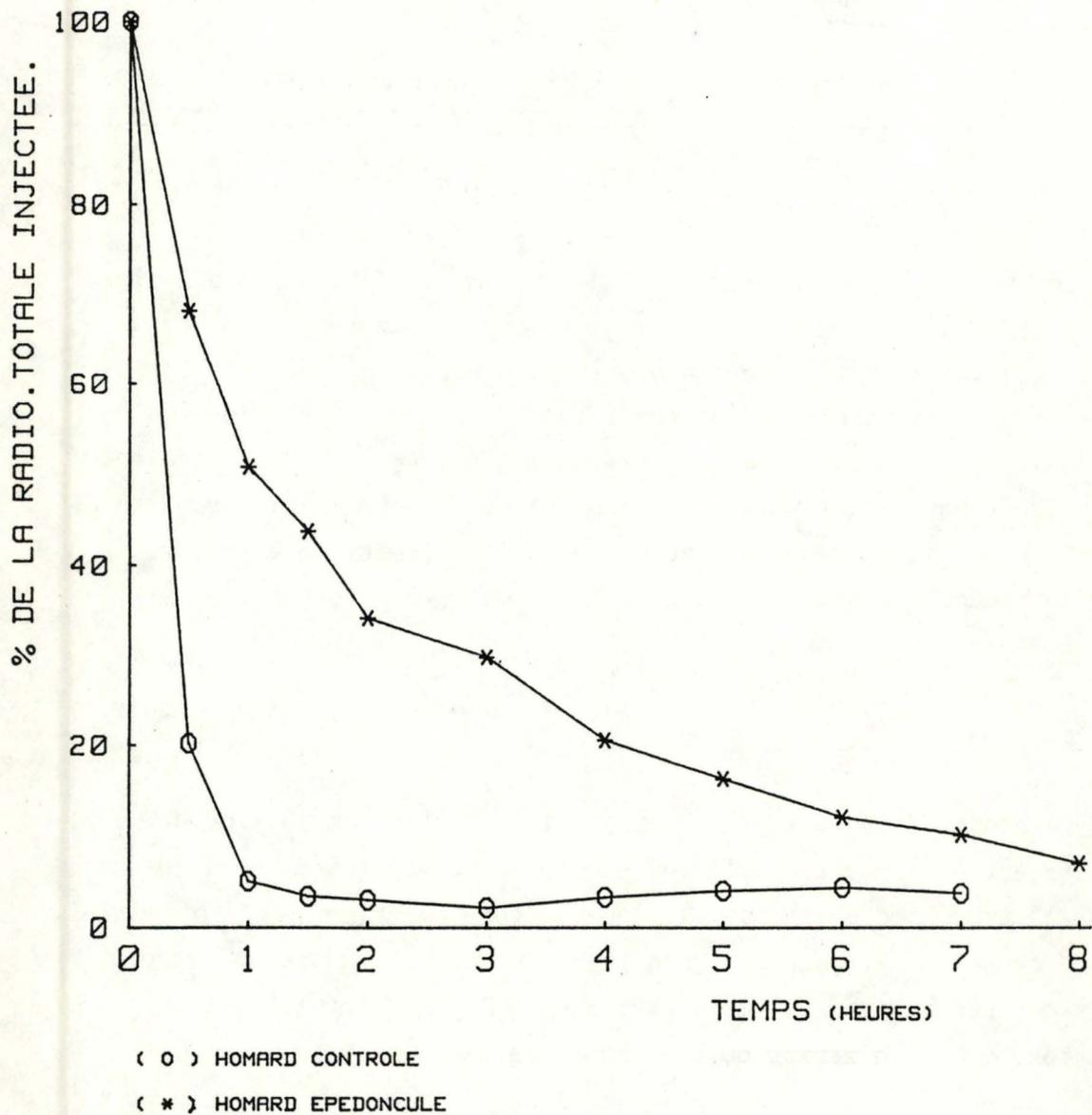


Figure 2.2.a. Evolution de la radioactivité dans l'hémolymph d'un individu épédonculé injecté d'une fraction hyperglycémiante (F.7).

2.2. Cinétique de disparition du  $[^{32}\text{P}] \text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans l'hémolymphe.

---

Nous procédons de manière identique au point 1.1.

Les résultats présentés au tableau 2.2.1 et à la figure 2.2.a sont exprimés en pourcentage du maximum injecté.

Temps en heures	% du maximum injecté
0	100
$\frac{1}{2}$	68,3
1	50,8
$1\frac{1}{2}$	43,8
2	34,1
3	29,7
4	20,5
5	16,2
6	11,9
7	9,99
8	6,93

Tableau 2.2.1.

La vitesse de disparition de la radioactivité dans l'hémolymphe est relativement constante quoique un peu plus élevée dans les trente premières minutes.

Elle est beaucoup plus lente que chez l'animal contrôle dont la cinétique est reprise sur la même figure.

Aucune protéine phosphorylée circulante n'a été mise en évidence.

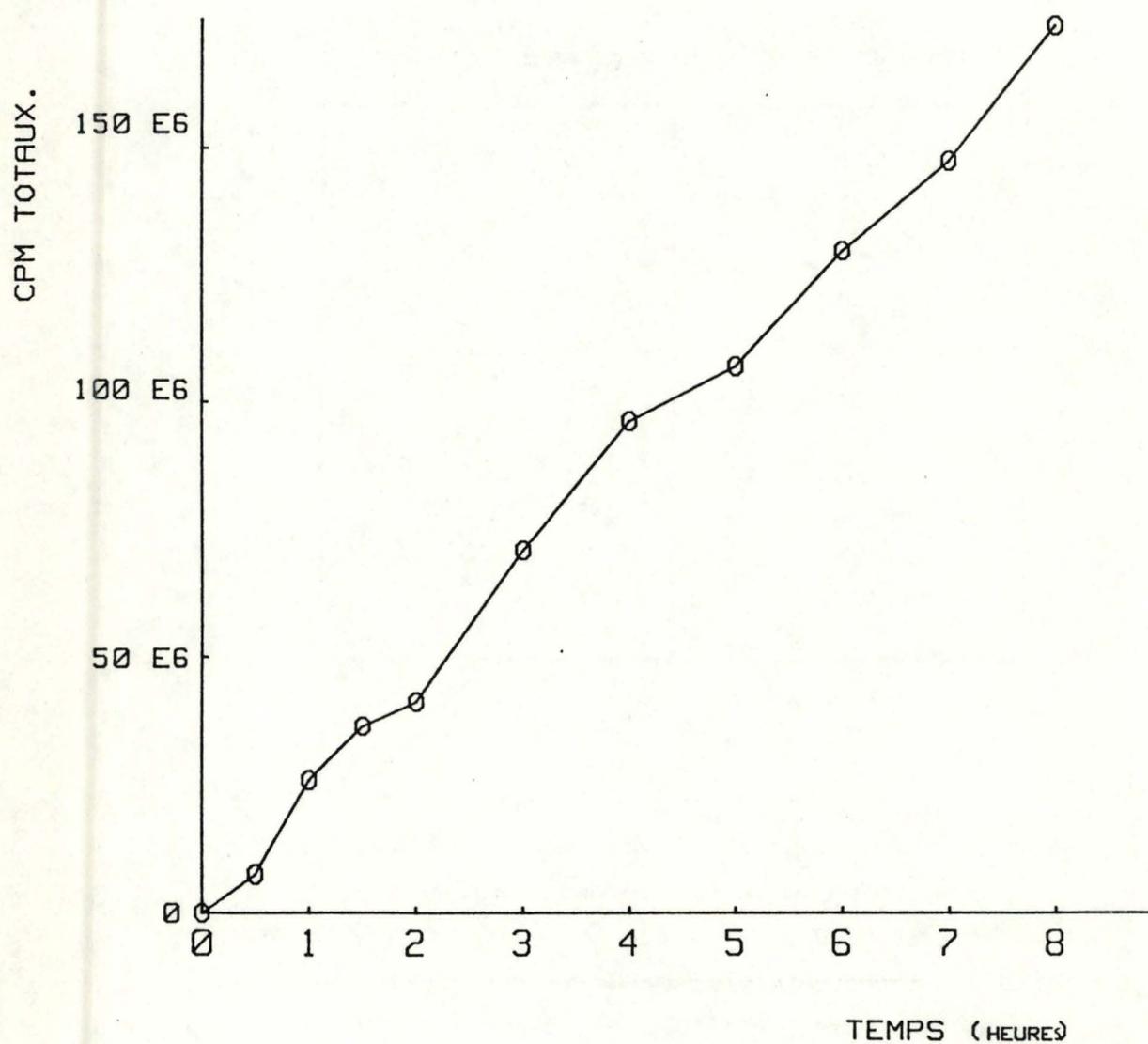


Figure 2.3.a. Evolution du rejet de la radioactivité dans l'eau de mer par un homard épédonculé injecté d'une fraction hyperglycémiant (F.7).

### 2.3. Evolution de la radioactivité dans l'eau de mer.

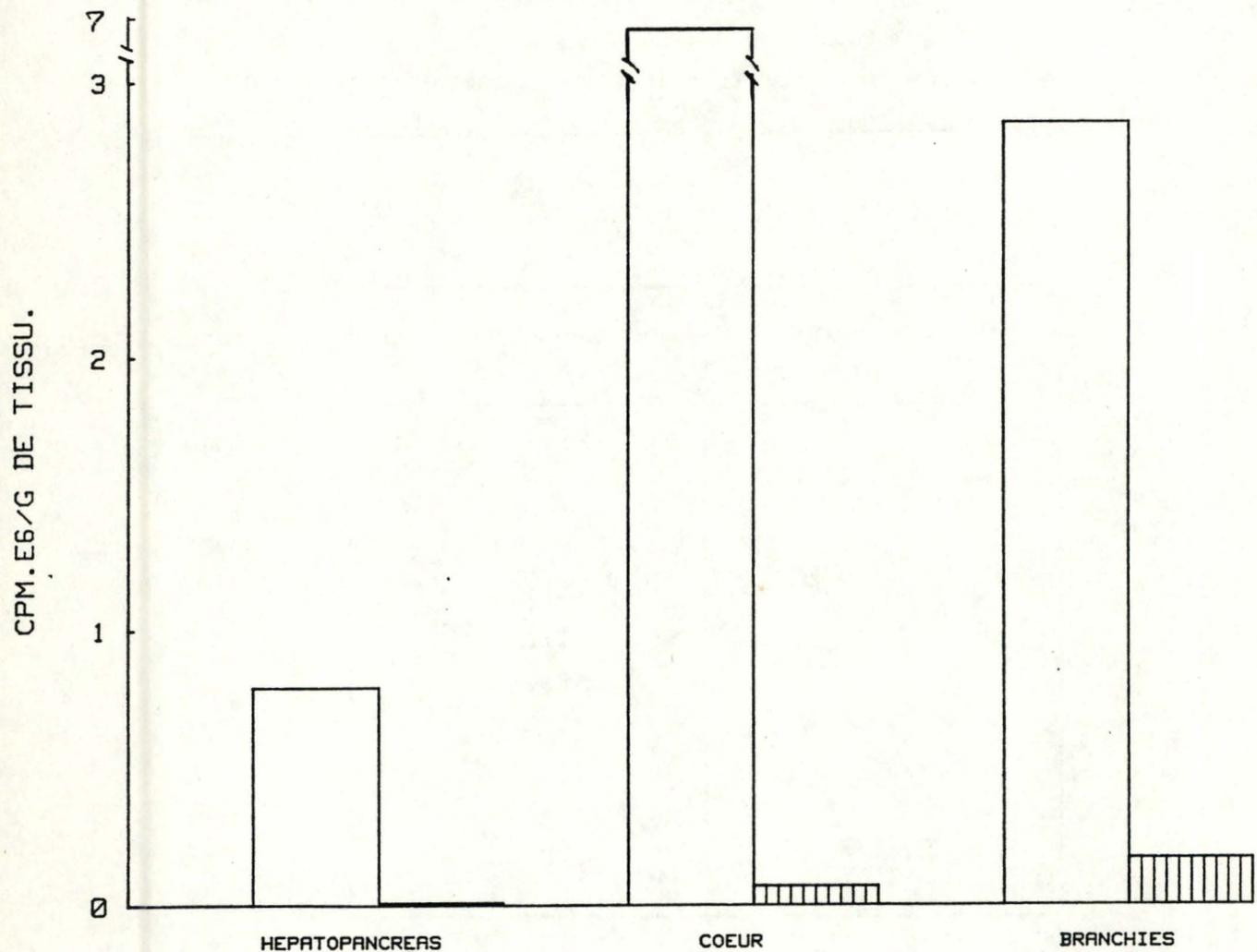
Parallèlement aux prélèvements effectués dans l'hémolymphe, nous mesurons la radioactivité de l'eau de mer.

Les valeurs auxquelles on a soustrait le blanc, sont présentées au tableau 2.3.1 et à la figure 2.3.a.

Temps en heure	cpm totaux cumulatifs $\times 10^6$
$\frac{1}{2}$	7,4
1	25,7
$1\frac{1}{2}$	36,4
2	41,2
3	71,1
4	96,2
5	107
6	130
7	146
8	174

Tableau 2.3.1.

Bien que la disparition du marqueur dans l'hémolymphe soit lente, on observe une fuite très importante vers l'extérieur; elle correspond pratiquement à la moitié du total injecté à l'animal.



(NON HACHURE) CAPTURE TOTALE DS L'ORGANE  
 (HACHURE) INCORPORATION DS LES PROTEINES

Figure 2.4.a. Capture totale et incorporation de la radioactivité dans les protéines de trois organes d'un individu épédonculé injecté d'une fraction hyperglycémiant (F.7).

#### 2.4. Radioactivité dans les organes.

La radioactivité totale et celle liée aux protéines ont été mesurées comme au § VI des "Techniques".

Elles sont présentées au tableau 2.4.1 et à la figure 2.4.a.

	Capture totale en cpm/gr de tissu	Incorporation dans les protéines en cpm/gr de tissu	% du total
Hépatopancréas	790.000	10.056	1,3
Coeur	6.840.000	67.621	1
Branchies	2.850.000	168.448	6

Tableau 2.4.1.

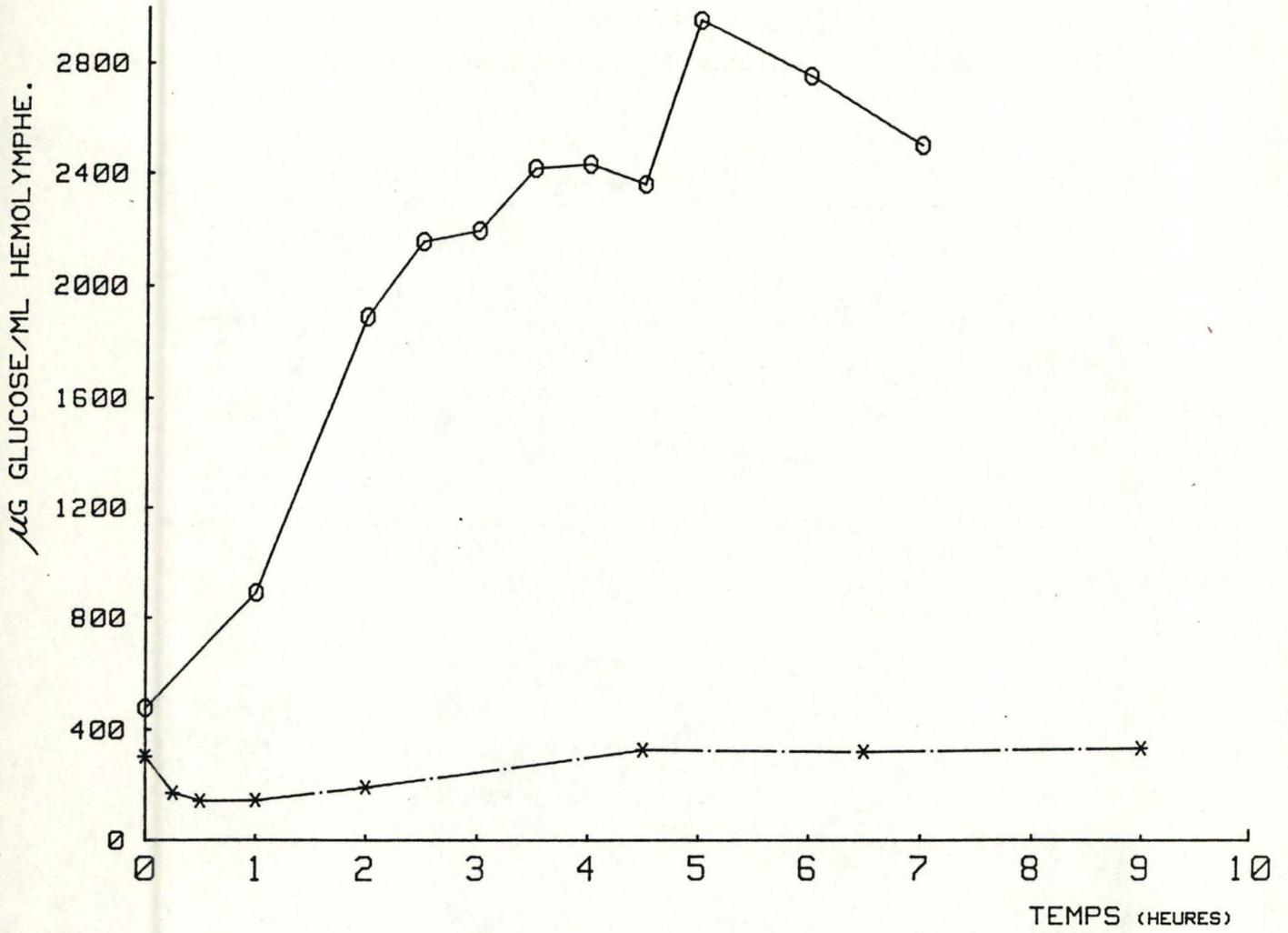
L'accumulation du marqueur se fait majoritairement dans les branchies. La fraction incorporée aux protéines est plus faible que ce qui est observé dans l'animal normal sauf au niveau des branchies où elle est augmentée de deux fois.

#### 2.5. Electrophorèse et autoradiographie.

Le culot protéique obtenu après traitement au TCA (cfr § VI dans "Techniques") est resuspendu dans le tampon particulier à l'électrophorèse. Les caractéristiques du culot d'un point de vue radioactif sont données au tableau 2.5.1.

	cpm/gr de culot	cpm déposé sur le gel ( dans 30 $\mu$ l )
Hépatopancréas	34.242	339
Coeur	107.879	1.068
Branchies	170.152	1.685

Tableau 2.5.1.



( \* ) CONTROLE COLE  
 ( o ) INJECTE AU F7

Figure 3.1.a. Evolution de la glycémie d'un homard normal injecté de la fraction hyperglycémiant (F.7).

Pour les électrophorèses (non présentées) les étalons utilisés sont identiques à ceux de l'expérience effectuée sur l'animal contrôle ( cfr § 1.5)

On observe des bandes phosphorylées sur l'autoradiographie.

Les seules qui sont décelables sont localisées dans les faibles poids moléculaires.

Dans les branchies, nous observons approximativement sept bandes, toutes de PM inférieur à 95.000 daltons.

La première bande est comprise entre 95.000 et 43.000, deux d'entre elles sont localisées entre 20.100 et 30.000, deux autres sont dans la zone comprise entre 14.000 et 20.100 et la dernière correspond au front de migration.

Ces résultats ressemblent à ce qu'on observe chez le normal.

Dans le coeur, nous observons cinq bandes dont le p.M est situé sous 43.000.

La première correspond à la zone de 30.000 daltons.

Les deux suivantes sont comprises entre 20.100 et 30.000.

La dernière, séparable du front, se caractérise par un P M compris entre 20.000 et 14.000.

Nous retrouvons également la bande phosphorylée correspondant au front.

Remarquons ici, qu'aucune trace de radioactivité dans l'hétopancreas n'est décelable.

### 3. Etude des phosphorylations chez un individu normal injecté du facteur

#### hyperglycémiant F.7.

Le homard utilisé dans cette expérience pèse 518 gr; il est placé dans 10,5 litres d'eau de mer. Tout comme pour l'animal épédonculé, nous lui injectons l'équivalent en fraction F.7 d'un demi pédoncule oculaire. Si une hyperglycémie s'amorce, nous lui injectons le marqueur radioactif après deux heures.

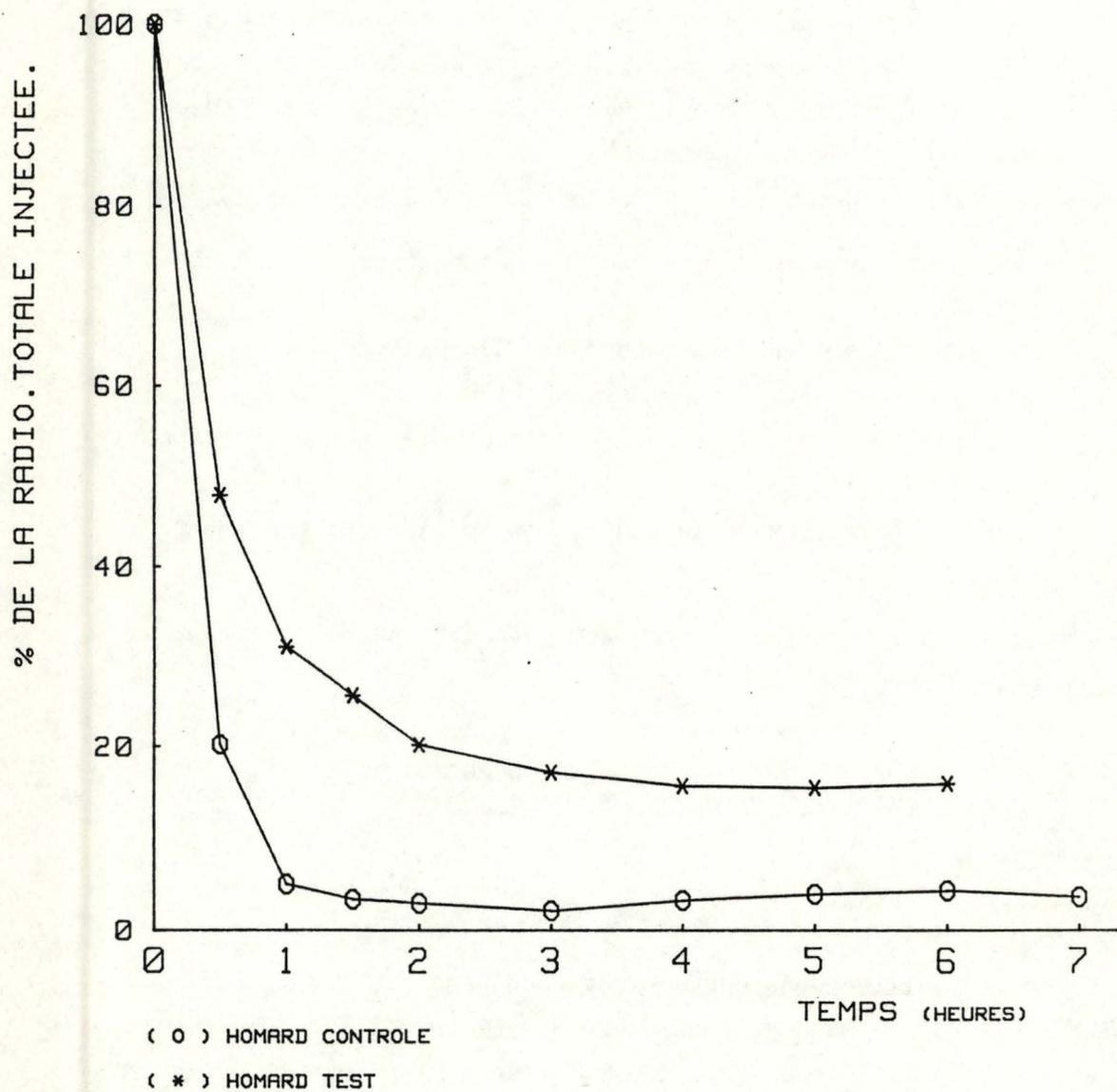


Figure 3.2.a. Evolution de la radioactivité dans l'hémolymphe d'un individu normal injecté d'une fraction hyperglycémiante (F.7).

### 3.1. Evolution de la glycémie.

Le taux de glucose sanguin a été mesuré avant traitement au facteur hyperglycémiant (F.7). Sa valeur a été calculée à 0,48 mg/ml par dosage à la glucose - oxydase et peroxydase (cf § II dans "Dosages").

Une heure après injection, la concentration en glucose a doublé. Un plateau est atteint après trois heures et se maintient pendant quatre heures. Le maximum atteint correspond à six fois et demi le taux initial. L'évolution de la glycémie de cet homard et d'un contrôle injecté de solution de Cole apparait à la figure 3.1.a.

### 3.2. Cinétique de disparition de la radioactivité dans l'hémolymphe.

L'animal a été injecté de  $[^{32}\text{P}] \text{Na H}_2 \text{PO}_4$ , deux heures après lui avoir inoculé la fraction hyperglycémiant. Les résultats des comptages à intervalles réguliers sont repris dans le tableau 3.2.1 et à la figure 3.2.a où ils sont exprimés en pourcentage du maximum injecté.

Temps en heure	% du maximum injecté
0	100
$\frac{1}{2}$	48
1	31
$1\frac{1}{2}$	25,7
2	20,1
3	17
4	15,6
5	15,4
6	15,8

Tableau 3.2.1.

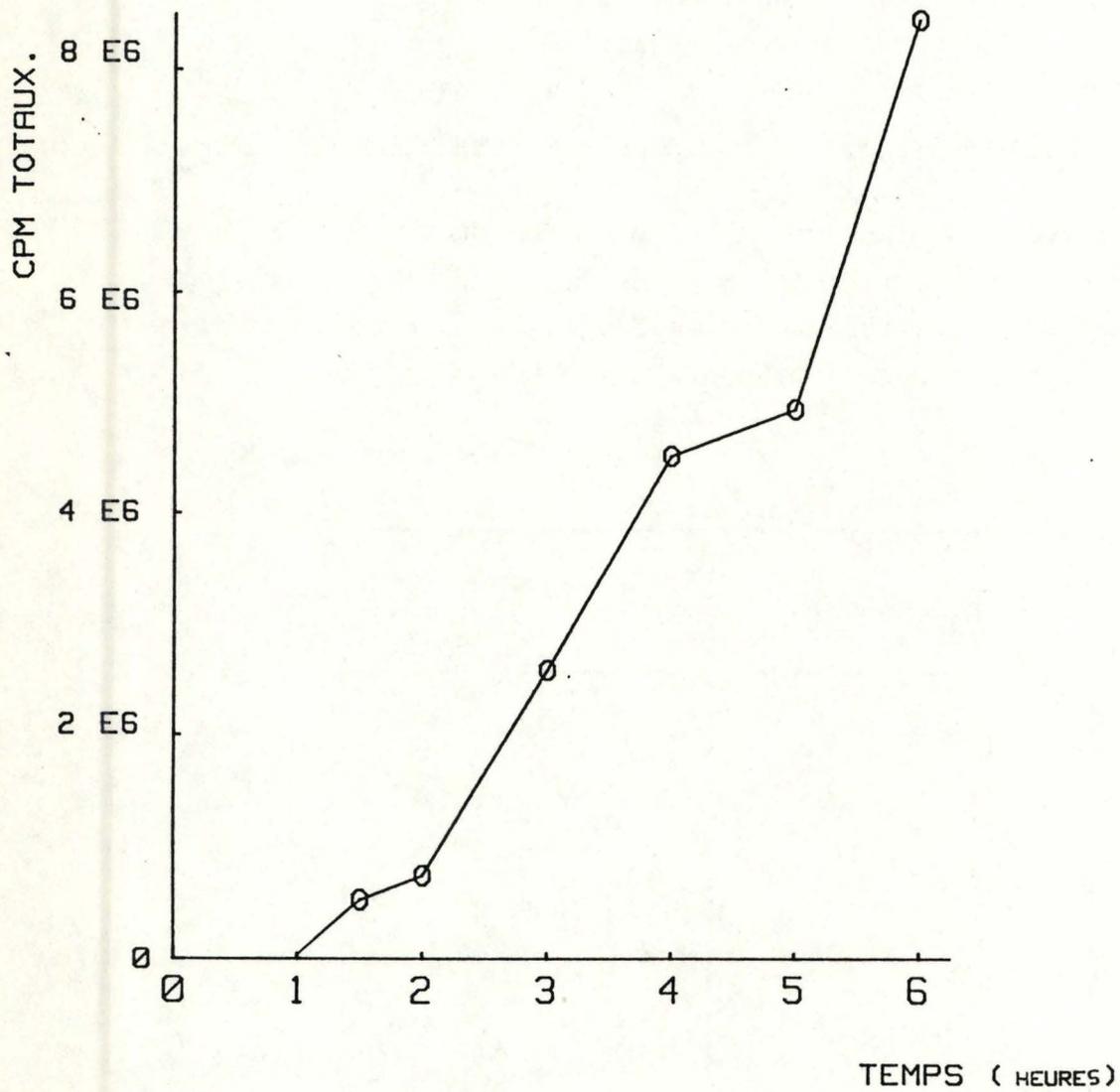


Figure 3.3.a. Evolution du rejet de la radioactivité dans l'eau de mer par un individu normal injecté d'une fraction hyperglycémiant (F.7).

La diminution de la radioactivité se marque surtout pendant les deux premières heures après l'injection. Ensuite elle atteint un plateau. Tout comme pour le homard épédonculé elle est plus lente que chez l'animal contrôle dont la courbe est également reprise sur cette même figure 3.2.a. Aucune incorporation de  $^{32}\text{P}$  aux protéines circulantes n'a pu être mise en évidence.

### 3.3. Evolution de la radioactivité dans l'eau de mer.

L'excrétion de l'isotope radioactif est suivi tout au long de l'expérience. Les résultats représentés au tableau 3.3.1 et à la figure 3.3.a sont exprimés en cpm totaux.

Temps en heure	cpm totaux cumulatifs $\times 10^6$
$\frac{1}{2}$	--
1	--
$1\frac{1}{2}$	0,53
2	0,74
3	2,60
4	4,56
5	5,00
6	8,5

Tableau 3.3.1.

Après une latence d'une heure, le homard commence à rejeter le marqueur radioactif. Par la suite, la vitesse d'excrétion reste assez constante. La fraction éliminée ne représente, cette fois que environ deux pour cent du total injecté.

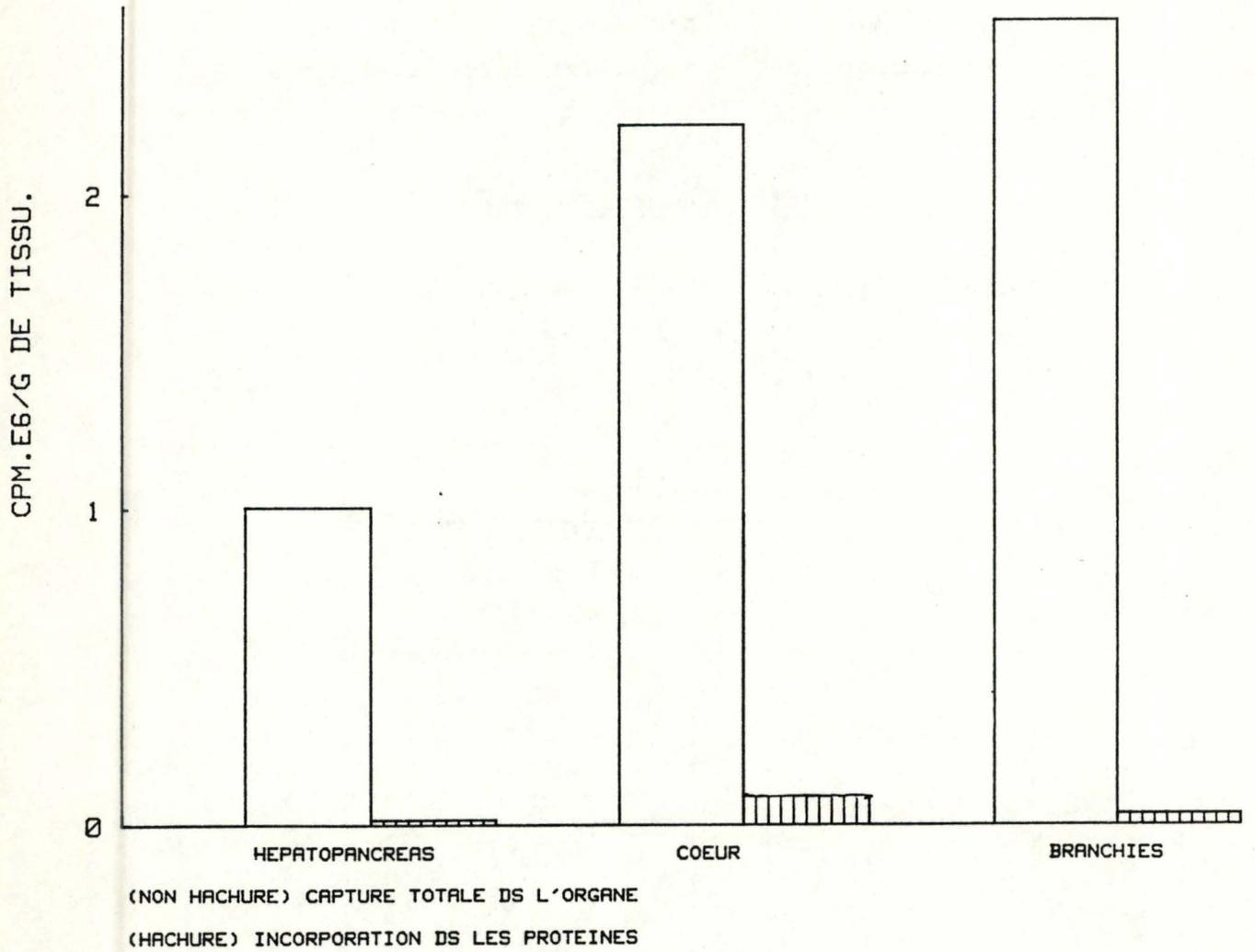


Figure 3.4.a. Capture totale et incorporation de la radioactivité dans les protéines de trois organes d'un individu normal injecté de la fraction hyperglycémiant (F.7).

### 3. 4. Capture de la radioactivité dans les organes et incorporation dans les protéines.

La radioactivité totale et celle liée aux protéines ont été mesurées par la méthode explicitée au § VI dans "Techniques".

Le tableau 3.4.1 et la figure 3.4.a reprennent ces résultats.

	Capture totale en cpm/gr de tissu	Incorporation dans les protéines en cpm/rg de tissu	% du total
Hépatopancréas	1.005.000	16.700	2
Coeur	2.220.000	98.743	4,5
Branchies	2.549;000	34.973	1,5

Tableau 3.4.1.

Parmi les trois organes testés, le coeur est celui qui capte le plus de radioactivité par unité de poids.

L'incorporation dans la fraction protéique semble la plus importante également dans cet organe.

### 3.5. Electrophorèse et autoradiographie.

Après traitement au TCA, le culot est resuspendu dans le tampon d'électrophorèse. Les caractéristiques de ce culot au point de vue radioactivité sont présentées au tableau 2.5.1. Pour l'électrophorèse (non présentée ici), l'étalonnage a été réalisé dans les mêmes conditions que dans le point 1.5.

	en cpm/gr de culot	cpm déposé sur le gel (dans 30 $\mu$ l)
Hépatopancréas	50.606	501
Coeur	72.727	720
Branchies	71.667	710

Tableau 2.5.1.

L'autoradiographie ne montre aucune bande phosphorylée si ce n'est à la hauteur du front de migration.

DISCUSSION.

- DES RESULTATS "IN VITRO!"
- DES RESULTATS "IN VIVO!"

## Discussion des expériences "in vitro."

Le but était d'étudier les phosphorylations de substrats endogènes par les protéines kinases endogènes. Il était donc requis de travailler sur un milieu le plus complet possible, nous avons donc utilisé soit un homogénat brut, soit un extrait réalisé à basse vitesse (1.500 g) afin de conserver un maximum d'enzymes et de substrats. ?

Le système de référence nous a permis de tester nos conditions expérimentales. Celles-ci paraissent adaptées pour obtenir des phosphorylations et, en outre, le système peut être modulé; soit inhibé par traitement à l'EDTA, soit stimulé par l'ajout de nucléotides cycliques. L'EDTA est un chélateur des ions divalents qui sont nécessaires pour l'activité de la kinase; dès lors, leur capture provoque une inhibition importante voire même totale de cet enzyme. La protéine kinase purifiée, utilisée dans le système de référence est de type A, c'est-à-dire qu'elle est très sensible à l'AMP cyclique, qui favorise sa dissociation en sous-unités R & C. Seule la forme dissociée possède l'activité kinase.

L'homogénat d'hépatopancreas de crabe, pourvu que l'inhibition des protéases, des phosphatases, des ATPases, des phosphodiesterases soit assurée, est capable d'incorporer du  $^{32}\text{P}$  à partir d'un précurseur, le  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  dans la fraction protéique fixée sur papier. L'existence de protéines kinases dans cet organe était connue (Willemet, 1981), l'incorporation doit donc résulter de leur activité.

La non-linéarité du système en fonction du temps est un point obscur. Il pourrait s'agir d'une adsorption aspécifique du  $^{32}\text{P}$  sur les papiers filtres utilisés pour fixer les protéines. Cette hypothèse doit être écartée car les valeurs des blancs que nous réalisons sont nettement inférieures à celles des tests et, aussi, parce que l'incorporation de  $\text{P}^{32}$  augmente en fonction du temps même si ce n'est pas de façon linéaire. ?  
 La cinétique observée dans ce cas, a l'allure d'une courbe de saturation. Comme facteur limitant, on songe d'abord aux substrats endogènes et à l'ATP exogène. Etant donné que nous travaillons sur un homogénat brut, en présence d'inhibiteurs de protéases, il nous paraît peu probable que les substrats soient rapidement épuisés par les kinases. Quant à la fraction de l'ATP incorporée, elle n'excède jamais trente pour cent.

ajout ? fait ?

Pas de cinétique  
des Blancs ?  
fait ?

609  
Qui dit que l'incubation n'est pas déjà synonyme de phosphorylation? (ATPphoid)

Une autre explication plausible serait que les sites phosphorylables des substrats le soient déjà. Cette éventualité a été testée en effectuant une préincubation de l'homogénat sans NaF (inhibiteur de phosphatases); de cette manière, les groupements phosphate seraient enlevés aux substrats et l'incorporation effectuée après cette manipulation devrait être plus importante. Nos résultats négatifs ne nous permettent pas d'appuyer cette hypothèse. Nous sommes dès lors incapables de dire si la cinétique observée résulte soit d'une occupation préalable des sites phosphorylables, soit, de la présence d'un inhibiteur dont nous ferons mention plus loin.

La dernière interprétation que nous envisageons est liée à l'autophosphorylation des protéines kinases endogènes. Celle-ci serait très rapide et intense ce qui surestimerait les premiers points de la cinétique. Dans cette hypothèse, la réaction de phosphorylation serait divisée en deux étapes: l'autoactivation de la kinase elle-même suivie de l'accrochage du phosphate au substrat.

Si la première étape correspond à la première partie de la courbe (relativement linéaire), un tel système biologique nous paraît peu efficace puisque, pour phosphoryler un substrat, la kinase devrait l'être elle-même de manière bien plus importante. Nous avons pu estimer grossièrement, sur une fraction partiellement purifiée, l'autophosphorylation des protéines kinases de l'hépatopancréas de homard en présence d'AMP cyclique. Pour des temps d'incubation courts, inférieurs ou égaux à cinq minutes, la kinase seule incorpore environ 50 pmoles de  $^{32}\text{P}$  par mg de PK. Ce résultat est comparable à ce qu'on observe avec la molécule commerciale isolée à partir du cœur de boeuf. Si ce calcul est fiable, cela signifierait que dans nos tests "in vitro", cette autophosphorylation ne représente pas plus de un pour cent de l'incorporation.

L'homogénat d'hépatopancréas de homard présente généralement ce genre de cinétique de saturation. Il est probable qu'il s'explique de façon identique à ce qui vient d'être dit. Remarquons toutefois la relation quasi linéaire obtenue pour des temps d'incubation longs (10 et 20 minutes) avec deux concentrations en ATP, en présence ou non d'AMP cyclique (cf fig. II. 2.a et II.2.b)

Le type de cinétique obtenue, soit une linéarité en fonction du temps soit une courbe de saturation, nous paraît totalement lié à l'homogénat lui-même.

En utilisant l'homogénat ou l'extrait à basse vitesse en présence du système de référence et d'AMPc, nous avons pu mettre en évidence une inhibition des phosphorylations. L'allure de la courbe d'inhibition est intéressante à étudier ( cf fig. III.2.a ). Elle se caractérise par une étape de phosphorylation rapide suivie d'un plateau. Il vaut la peine de comparer cette courbe au systèmes non linéaires obtenus (cf fig. II.1.a ). Leur non linéarité pourrait s'expliquer au moins partiellement par l'action d'un inhibiteur.

Un premier essai de caractérisation d'inhibiteur à partir d'homogénat d'hépatopancréas de homard a consisté en une chromatographie sur tamis moléculaire (Séphadex G25). Nous souhaitons séparer la sous-unité C de PM proche de 38.000 daltons et un inhibiteur de dont le PM serait de 34.000 daltons (selon Donnelly, 1973). Pour ce faire, nous aurions dû utiliser une colonne de DEAE-cellulose, échangeuse d'ions car l'inhibiteur semble être une protéine chargée, très thermostable. Malheureusement, nous avons été limités par le temps. Cependant, grâce à notre colonne, nous avons pu séparer des fractions non inhibitrices d'autres qui le sont totalement et isoler une molécule de petit PM, montrant un coefficient d'extinction maximum à 272 nm, protecteur voire même activateur des phosphorylations (cf fig. III. 3.2.c ). Il s'agit d'autre chose que le 3',5'-AMP puisque sa présence entraîne une stimulation de la kinase elle-même déjà stimulée par une dose saturante du nucléotide cyclique.

Nous n'avons pas pu séparer l'unité catalytique de l'inhibiteur. En effet, lorsque la fraction trois est testée seule, elle montre une activité kinase ( tout en tenant compte qu'il ne s'agit pas d'un système complet) et, lorsqu'on y ajoute le système de référence, l'inhibition de ce dernier est quasi à son maximum. Il s'indique donc de vérifier si cet inhibiteur correspond au modulateur décrit par Donnelly (1973). Il suffirait de chauffer l'homogénat pendant quelque temps, voire même cinq heures, à 95°C et de mesurer sa capacité inhibitrice. S'il s'agit du modulateur dont les caractéristiques sont données dans l'introduction au § II.8, il ne doit avoir subi aucun dommage.

La concentration en modulateur peut varier avec les conditions physiologiques dans lesquelles l'animal se trouve. Le jeûne induit notamment, dans le cœur de lapin, une diminution de sa concentration (Walsh & Ahsby, 1973).

*Mait?*

L'homogénat d'hépatopancréas pour lequel l'incorporation était linéaire en fonction du temps (cf fig. II.2.a & fig. II.2.b) a été réalisé au mois de janvier. Ces animaux ne se nourrissent pas pendant l'hiver; il est donc tout à fait possible que, dans de telles conditions, la concentration en modulateur puisse être faible.

Un autre type d'inhibiteur a été mis en évidence dans l'hépatopancréas d'un mollusque, Helix pomatia ( Wieser & Reinhard, 1982). Cet inhibiteur, cette fois spécifique d'un tissu, agit sur les protéines kinases et serait couplé à un système qui retarde son action. Ceci permettrait d'arrêter les phosphorylations lorsque la concentration en ADP augmente. Il s'agirait donc d'un système autorégulé. Nous pensons que l'inhibiteur suspecté dans notre homogénat aurait des caractéristiques similaires, car, comme, lui il ne se sépare pas de la kinase après chromatographie sur Séphadex G 25.

## Discussion des résultats des expériences "in vivo".

Nous avons suivi l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans certains organes-cibles de l'hormone hyperglycémiant et les modifications que cette dernière induit dans les phosphoprotéines.

Trois homards ont été conditionnés de la manière suivante: le premier servant de contrôle a été uniquement injecté d'isotope radioactif; le second a été épédonculé suffisamment longtemps avant l'expérience pour éliminer tout facteur hormonal issu des pédoncules, et a été injecté d'un facteur hyperglycémiant. Ce test nous a permis de mesurer l'effet propre de ce facteur. Le troisième animal, cette fois non épédonculé a été injecté de la même fraction. Par ce test, nous amplifions la réponse hormonale qui, par ailleurs, peut être modulée par d'autres facteurs pédonculaires.

La disparition du marqueur a été suivie dans l'hémolymphe pour les trois traitements. De manière tout à fait générale, le homard "contrôle" résorbe beaucoup plus vite le marqueur radioactif que les deux "tests". La fraction hyperglycémiant excercerait donc chez ceux-ci, une inhibition sur la résorption probablement via une moindre perméabilité des membranes cellulaires.

La résorption plus rapide chez le contrôle n'est pas liée à un rejet plus important de produit radioactif. En effet, la quantité de radioactivité retrouvée dans l'eau de mer est tout à fait négligeable: elle est inférieure à un pour cent de la totalité injectée à l'animal. Le homard non épédonculé, injecté de fraction hyperglycémiant évacue une quantité de marqueur comparable au non traité. Quant à l'individu épédonculé, il excrète environ la moitié de la dose recue.

Lorsqu'on compare la capture du marqueur dans les organes, le coeur est celui qui en accumule le plus, excepté chez l'individu normal injecté du facteur hyperglycémiant, où les branchies en accumulent légèrement plus que lui. Dans les trois cas, c'est l'hépatopancreas qui accumule le moins de radioactivité.

La fraction du marqueur associé aux protéines est faible par rapport au total accumulé. Elle n'excède jamais plus de onze pour cent (maximum observé pour le coeur chez l'individu normal). Les branchies de l'individu épédonculé incorporent dans leurs protéines six pour cent de la radioactivité captée.

Le marqueur accumulé dans l'organe et qui n'est pas associé aux protéines pourrait de retrouver notamment dans les phospholipides, les acides nucléiques et dans les protéines de structure.

La stimulation de l'incorporation dans les protéines branchiales pourrait être signe d'une excrétion intense. En effet, cet organe joue un rôle important dans l'osmorégulation et, donc, dans l'excrétion. Devant travailler intensément, les branchies pourraient capter une quantité plus importante de  $^{32}\text{P}$  et l'incorporer dans leurs protéines. Ces molécules enrichies d'un lien phosphate énergétique permettraient un métabolisme accru. De façon générale, il semblerait que l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  soit liée à l'activité de l'organe, ce qui pourrait expliquer l'incorporation minimale observée dans l'hépatopancreas.

L'électrophorèse a été utilisée afin d'identifier les protéines phosphorylées. La quantité de matériel radioactif contenu dans les protéines étant tellement faible, il a fallu déposer un maximum d'homogénat sur les gels afin d'observer des bandes en autotadiographie. Ceci associé au travail sur un système non purifié a donné des images électrophorétiques peu présentables; toutefois, l'efficacité de la méthode pour séparer une large gamme de poids moléculaire n'en a pas été altérée.

Les autoradiographies effectuées à partir de ces électrophorèses montrent quelques bandes phosphorylées de petit poids moléculaire qui se retrouvent en majorité dans le coeur et dans les branchies. Chez le contrôle, quelques bandes de PM plus élevé apparaissent dans le coeur mais la comparaison entre les trois résultats ne peut se faire directement et reste difficile. Il est en effet impossible de déposer à la fois une quantité comparable de protéines et de radioactivité. Un compromis doit être trouvé: il faut en même temps éviter un excès de protéines et trop peu de radioactivité. Dès lors, des variations qualitatives sont interprétables mais des variations quantitatives ne le sont certainement pas. Une autre difficulté est liée à l'isotope utilisé et plus précisément à son instabilité: sa demi vie n'est que de 14,2 jours.

Même si toutes les expériences pouvaient être réalisées le même jour, ce qui permettrait de mieux contrôler tant du point de vue protéines que radioactivité la quantité déposée sur les gels, on resterait limité à une comparaison quantitative.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.

## Conclusions et perspectives.

L'étude de la phosphorylation de substrats endogènes par les protéines kinases endogènes, dans l'hépatopancréas de homard a été abordée de deux manières; une approche "in vitro" et une approche "in vivo".

Le système "in vitro" permet de contrôler les paramètres du milieu ainsi que d'isoler les mécanismes de phosphorylation de tout contrôle externe. Cependant, ce matériel expérimental présente des limites inhérentes, notamment, au problème étudié lui-même. L'action d'un enzyme endogène sur un substrat endogène exige de travailler sur un milieu brut, le moins altéré possible. De ce fait l'efficacité d'un tel système nécessite l'emploi de nombreux inhibiteurs, encore accru par le type d'organe choisi. Le travail sur homogénat restreint l'étude de l'action des effecteurs; ainsi, ceux qui agissent via un récepteur membranaire ne peuvent être testés.

Exigence absolue? Expliquer?

Nous avons pu mettre en évidence dans l'homogénat, un inhibiteur de phosphorylations. D'un point de vue physiologique, il serait intéressant de le caractériser et surtout d'étudier son mécanisme d'action. Pour ce faire, il devrait être isolé puis testé sur l'enzyme. Si, comme décrit dans la littérature, cet inhibiteur montre une spécificité tissulaire, il est alors capital d'étudier son comportement en présence de kinases de même origine; ce qui impliquerait donc une purification de l'enzyme. Le travail serait probablement plus aisé en limitant l'étude de l'inhibiteur à une seule kinase bien précise.

note Chory

L'étude "in vivo", bien qu'intéressante, amène des résultats très difficiles à interpréter vu l'incapacité à contrôler tous les paramètres qui peuvent interférer. Cependant, sur l'animal vivant, l'étude des effecteurs agissant via un récepteur membranaire est tout à fait possible.

Ces deux types d'approche sont complémentaires bien que comportant des limites. Idéalement, il faudrait travailler sur cellules isolées. Avec un tel système, tous les effecteurs peuvent être testés. Il serait donc primordial d'être capable d'isoler des cellules à partir de l'hépatopancréas et de pouvoir les maintenir en vie suffisamment longtemps pour pouvoir y suivre les phosphorylations.

réaliste?

Est-ce que l'étude de l'inhibiteur peut être faite in vivo?

ABRAMOWITZ, A.A, HISAW, F.L., & PAPANDREA, D.N.

The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans  
Biol. Bull. Woods - Hole, 86, 1-5 (1944)

ANDREW, B.R. & SALEUDOIN, A.S.M.

Two - dimensional gel electrophoresis of neurosecretory polypeptide  
in crustacean eyestalk  
J. Comp. Physiol. 134 303-313 (1979)

APPELMANS, M.M, BERNBAUMER, L. & TORRES, HN.

Factors affecting the activity of muscle glycogensynthetase.  
III. The reaction with adenosine triphosphate,  $Mg^{++}$ , and cyclic 3'5' -  
adenosine monophosphate.  
Arch.biochem. biophys. 116, 39-43 (1966)

BATTELE, B.A & KRAVITZ, E.A (1977)

Targets of octopamine action in the lobster: cyclic nucleotide changes  
and physiological effects in hemolymph, heart and exoskeletal muscle.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 205, 435 - 448

BAUCHAU, A.G. & MENGEOT, J.C (1966)

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

BAUCHAU, A.G. & MENGEOT, J.C. & OLIVIER, M.A.

Action de la sérotonine et de l'hormone diabétogène des crustacés sur la  
phosphorylase musculaire.  
Gen. Comp. Endocr. 11 132 - 138 (1968)

BEALE G.E, DEDMAN, J.R & MEANS, A.R.

Isolation and characterization of a protein from Rat testis which inhibits  
cyclic AMP-dependent protein kinases and phosphodiesterases.  
J. Biol. Chem. 252 n°18 6322-6327 (1977)

BLASKESLEY R.W & BOEZI, J.A.

A new staining technique for protein in polyacrylamide gels using Coomassie  
Brilliant Blue G.250  
Analytical Biochem. 82 580-582 (1977)

BRUART C.

Influence de l'injection d'hormones sur la glycémie d'un crustacé décapode  
Macroure, Homarus americanus.

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques F.N.D.P. (1978)

CHEN, SHYM - LONG, P.M.-D

Professor: Dr. - KI-HAN KIM

The regulation of protein phosphorylation

Dissertation Abstract international vol. 44 n°12 3747 B. June 1984



COHEN, P.

The regulation of protein function by multisite phosphorylation.

Trends Biochem. Sci, 1 (1976).

COHEN, P.

Recently discovered of enzyme regulation by reversible phosphorylation.

Molecular aspects of cellular regulation volume 1.

Elsevier/North - Holland (1980)

COLE, W.H.

A perfusing solution for the Lobster (Homarus americanus) heart.

J.Gen.Physiol 25 , 1 (1941)

CORBIN, J.D., KEELY, S.L. & PARK, C.R.

The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate  
dependent protein kinases in adipose, cardiac and other tissues.

J. Biol. Chem. 250, 218 - 225 (1975).

CORI, G.T., & CORI, C.F.

The enzymatic conversion of phosphorylase a to b.

J. Biol. Chem. 158 , 321 - 332 (1945)

COSTA. M.

Endogenous protein kinase inhibitor levels Regulate changes in  
specific activity of protein kinase in quiescent cells stimulated  
to proliferate.

Biocem. Biophys. res. commun 78 n°4 (1977)

DEMAILLE, J.G, PETERS, K.A, FISCHER, E.H.  
Biochemistry 16 , 3080 - 86 (1977).

DEVOS, C.

Mise en évidence de plusieurs facteurs hyperglycémisants chez un crustacé Macroure Homarus americanus.

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques FNDP (1980)

DONNELLY, T.E, KUO, Jr. J.F, REYES,P.L, YUNG-PIN LIU & GREENGARD,P.  
Protein kinase modulator from Lobster muscle.

I. Stimulatory and inhibitory effects of the modulation on the phosphorylation of substrate proteins by adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and adenosine 3'5' - monophosphate - dependent protein kinases.

J. Biol. Chem. 248 n°1, 190 198 (1973).

DONNELLY, T.E, KUO, Jr, J.F, MIYAMOTO, E, & GREENGARD, P.  
Protein kinase modulator from Lobster Tail muscle.

II. Effects of the modulator on holoenzyme and catalytic subunit guanosine 3'5' -monophosphate dependent and adenosine 3'5'- monophosphate dependent protein kinases.

J. Biol. Chem. 248 n°1 199 - 203 (1973).

FESENKO, E.E, KRAPIVINSKY, G.B, MASLOV, A.A, PERVUKHIN, G.J.

Endogenous phosphorylation of proteins in silkworm Bombyx mori Antennar.

БИОХИМИЯ Т.3 n°3 (1984).

FLEISCHER,N., ROSEN,O.M, & REICHLIN,M.

Radioimmunoassay of bovine heart protein kinase.

Proc.Natl. Acad. Sci. USA 73, 54 -58 (1976).

GILES ,I.G., POAT, P.C., & MUNDAY,K.A.

The regulation of pyruvate kinase in the hepatopancreas of Carcinus maenas

Comp. Biochem. Physiol. vol 55 B. pp 423 - 427 (1976)

GILL, G.N., & GARREN, L.D.

A cyclic -3'5' - adenosine monophosphate dependent protein kinase from the adrenal cortex: Comparison with a cyclic AMP binding protein.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 335-343 (1970);

GILL, G.N., HOLDY, K.E., WALTON, G.M. & KANSTEIN, C.B.

Purification and characterization of 3',5' - cyclic GMP dependent protein kinase.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3918 - 3922 (1976).

GILL, G.N., WALTON, G.M., & SPEEDY, P.Y.

Guanosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase from bovine lung: subunit structure and characterization of the purified enzyme.

J. Biol. Chem. 252, 6443 - 6449 (1977).

GORGELS - KALLEN, J.L., & VAN HERP, F.

Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X - organ Sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordmann, 1842).

J. Morphol. 170, 347 - 355 (1981).

GORGELS - KALLEN, J.L., VAN HERP, F. & RSEN, L.

A comparative immunocytochemical investigation of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the eyestalk of some decapod Crustacea.

J. Morphol. 174, 161 - 168 (1982)

GOY, M.F., SCHWARZ, T.L., & KRAVITZ, E.A.

Serotonin - induced protein phosphorylation in a lobster neuromuscular preparation.

J. Neurosci. 4, 611 - 626 (1984)

GREEN, A.A., & CORI, G.T.

Crystalline muscle phosphorylase. I. Preparation, properties, and molecular weight.

HAKIM, G., CARPENE, E., CORTESI, P., & ISANI, G.

Regulation by phosphorylation - dephosphorylation of pyruvate kinase in Venus gallina and Scaphara inaequalis.

Comp. Biochem. Physiol. Vol 80 B. n° 1., pp 109 - 112 (1985).

IYNEDJIAN, P., & ARSLAN, Y.

Phosphorylation of histones and non-histone nuclear protein in liver cells stimulated by glucagon and cyclic AMP.

FEBS 2046 Volume 178 n°1 (Décembre 1984)

JAROS, P.P., & KELLER, R.

Immunocytochemical identification of hyperglycemic hormone - producing cells in the eyestalk of Carcinus moenas.

Cell. Issue Res. 204, 379 - 385 (1979)

KAGIMOTO, T., & UYEDA, K.

hormone - stimulated phosphorylation of liver phosphofructokinase "in vivo"

J. Biol. Chem. 254 n°13 5584 - 5587 (1979)

KAMAMOTO, F.I.

Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod crustacea.

Amer. Zool. 16, 141 - 150 (1976)

KELLER, R.

Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharid - Stoffwechsels beim Flusskrebs Cambarus affinis say.

Z. Vergl. Physiol. 51, 49 - 59 (1965)

KELLER, R.

Über eine hormonale regulation des glykogensynthese beim Flusskrebs, Orconectes limosus Rafinesque (Cambarus affinis Say)

Z. Verh. dt; Zool. Ges. 272 - 279. (1966)

KELLER R. & ANDREW, E.M.

The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone.

Gen. Comp. Ind. 20, 572 - 578 (1975).

KELLER, R.

Comparative electrophoresis Studies of Crustacean neurosecretory hyperglycemic and melanophore - stimulating hormones from isolated sinus glands.

J. Comp. Physiol. 122, 359 - 373 (1977).

KELLER & SEDLMEIER, D.

Hyperglycemic hormones in crustaceans.

In "Comparative endocrinology" (P.J. Gaillard & H.H. Boer, Eds.) pp 437- 440. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

KELLER, R. & WUNDERER, G.

Purification and amino acid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the shore crab, Carcinus moenas.  
Gen. Comp. Endocr., 34, 328 - 335. (1978).

KELLER, R.

Purification and amino acid composition of the hyperglycemic neurohormone from the sinus gland of Orconectes limosus and comparison with the hormone from Carcinus moenas.

J. Comp. Physiol., 141, 445 - 450. (1980).

KLEINHOLZ, L.H. & LITTLE, B.C.

Studies in the regulation of blood sugar concentrations in crustaceans.

I. Normal values and experimental hyperglycemia in Libinia emarginata.

Biol. Bull. 96, 218 - 227. (1949)

KLEINHOLZ, L.H., HAVEL, U.J., & REICHART, R.

Studies in the regulation of blood sugar concentration in crustaceans.

II. Experimental hyperglycemia and the regulatory mechanisms.

Biol. Bull. 49, 454 - 458 (1950)

KLEINHOLZ, L.H. & KELLER, R.

Comparative studies in crustacean neurosecretory hyperglycemic hormones.

I. The initial survey.

Gen. Comp. Endocr. 21, 554 - 564 (1973).

KLEINHOLZ, L.H.

Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity.

Amer. Zool. 16, 151 - 166 (1976).

KREBS, E. & BEAVO, J.A.

Phosphorylation - dephosphorylation of enzymes.

Ann. Rev. Biochem. 48, 923 - 959 (1979).

KREBS, E.G., GONZALEZ, C., POSNER, J.B., LOVE, D.S., BRATVOLD, G.E., & FISCHER, E.H.

Dans "Control of glycogen Metabolism", p. 200

ED. W.J. Whelan, Churchill, London.

KUO, J.F., & GREENGARD, P.

An adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase from Escherichia coli.  
J. Biol. Chem. 244 , 3417 - 3419 (1969 - a).

KUO, J.F. & GREENGARD, P.

Cyclic nucleotid dependent protein kinases.

IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase in various tissues and phyla of animal kingdom.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64 , 1349 - 1355 (1969 - b).

KUO, J.F.

Changes in activities of modulators of cyclic AMP - dependent and cyclic GMP - dependent protein kinases in pancreas and adipose tissues from alloxan-induced diabetic rats.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 65 n°4 (1975)

KUO , W.N. & KUO, J.F.

Isolation of Stimulatory modulator of guanosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase from mammalian Heart Devoid of inhibitory modulator of adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase

J. Biol. Chem. 251 , n°14, pp 4283 - 4286 (1976).

LEMOS J.R., & BERLIND, A.

Cyclic adenosine monophosphate mediation of peptide neurohormone effects on the lobster cardiac ganglion.

J. exp. Biol. 90 , 307 - 326 (1981).

LEVITAN, I.B. & BARONDES, S.H.

Octopamine and serotonin - stimulated phosphorylation of specific protein in the abdominal ganglion of Aphysia californica.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 71 n°4 pp. 1145 - 1148 (1974)

LINCOLN, T.M., DILLS, W.L., & CORBIN, J.D.

Purification and subunit composition of guanosine 3',5' - monophosphate dependent protein kinase from bovine lung.

J. Biol. Chem. 252, 4269 - 4275. (1977- b).

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARK, A.L. & RANDALL, R.J.  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193 , 265 - 275. (1951).

MIYAMOTO, E., KUO, J.F., & GREENGARD, P.  
Cyclic nucleotid - dependent protein kinases.  
III. Purification and properties of adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase from bovine brain.  
J. Biol. Chem. 248 , 179 - 189. (1969).

MURAD, F.  
Technique for the formation, partial purification and assay of a cyclic AMP inhibitor.  
In "Methods in enzymology" vol. XXXVIII, p. 273 - 283.  
New-York: Academic Press.

MURRAY, A.W., FROSCIO, M. & ROGERS, A.  
Dissociation of rabbit muscle cyclic AMP - dependent protein kinase into catalytic and regulatory subunits by p - chloromercuribenzoate and methylmercuric chloride.  
Febs. letters , 48 , 238 - 240 ( 1974).

PAVARTHY.  
Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustacean.  
I. Effect of eyestalk removal in Ocypoda platytaris.  
Mar. Biol. 14 , 58 - 62. (1972).

PITTMAN , R.C., KHOO, J.C., & STEINBERG, D.  
Cholesterol esterase in rat adipose tissue and its activation by cyclic adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase.  
J. Biol. Chem. 250 , 4505 - 4511.

RALL, T.W., SUTHERLAND, E.D., BERTHET, J.  
The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase.  
IV. Effects of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates.  
J. Biol. Chem. 224 , 463 - 475. (1957).

RAMAMURTHY, R., MUMBACH, M.W., SCHEER, B.T.

Endocrin control of glycogen synthesis in a crab.

Comp. Biochem. Physiol. 26 , 311 - 319. (1968).

RENARD, Ch.

Influence de l'injection de bioamines sur la glycémie d'un crustacé décapode macroure, Homarus americanus (MILNE EDWARDS)

Mémoire de licence en Sc. Zoologique. F.N.D.F. (1980).

RIQUELME, P., HOSEY, M.M., MARCUS, F., & KEMP, R.G.

Phosphorylation of muscle phosphofructokinase by the catalytic subunit of cyclic AMP- dependent protein kinase.

Biochem. Biophys. Res. Commun , 85 , n°4 1480 - 1487.

RUDOLPH, A.S., & KRUEGER, B.F.

Endogenous protein phosphorylation and dephosphorylation.

in " Adv. Cyc. Nuc. Res" 10

Edited by G.BROOKER, P. GREENGARD, & G.A. ROBINSON.

Raven Press, New-York. (1979).

SCHWARBE, C.W., SCHEER, B.T., & SCHEER, M.A.R.

The molt cycle in Panulirus japonicus.

Part. II. Of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans.

Physiol. Comp. Gecol. 2, 310 - 320. (1952).

SCHWARZ, T.L., PHD.

Proctolin in the Lobster and protein phosphorylation in a Lobster muscle.

Dissertation Abstracts International. Vol: 44 n°12 3676 b- 3677b. June 1984.

SEDLMEIER, D.

Species specificity of the crustacean hyperglycemic hormone (HGH): A Study on the cyclic AMP level.

Gen. comp. End. 40, pp. 365. Abstract n°146. ( 1980).

SELDMEIER, D. & KELLER, R.

The mode of action of the Crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone.

Gen. Comp. end. 45 , 82 - 90. (1981).

SHOJI, M., BRACKETT, N.L., TSE, J., SHAPIRA, R., & KUO, J.F.

Molecular Properties and mode of action of homogenous preparation of stimulatory modulator of cyclic GMP - dependent protein kinase from the heart.

J. Biol. Chem. 253, n° 10, pp 3427 - 3434. (1978).

SIEBENALLER, J.F.

Regulation of pyruvate kinase in Mytilus edulis by phosphorylation - dephosphorylation.

Marine Biology Letters 1. 105 - 110 (1979).

STORKOWSKI, E.F., RYKIERT, M., LIPINSKA, B.

Hyperglycemic hormone from the eyestalk of the Shrimp Crangon crangon.

Gen. Comp. Ind. 33, 460 - 466. (1977).

SODERLING, T.R.

Role of hormones and protein phosphorylation in metabolic regulation Symposium.

Symposium presented by the American Physiological Society at the 65 th. annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Atlanta, Georgia April 13. (1981).

SPINDLER, K., WILLIG, A., & KELLER, R.

Cyclic nucleotides and crustacean blood glucose levels.

Comp. Biochem. Physiol., 54, 301 - 304. (1975).

SUTHERLAND, E.W.

Activation of phosphoglucomutase by metal - binding agents.

J. Biol. Chem. 180, 1279 - 1283. (1949).

SZMIGIELSKI, A., GUIDOTTI, A., & COSTA, E.

Endogenous protein kinase inhibitors. Purification, characterisation, and distribution in different tissues.

J. Biol. Chem. 252, n°11 pp 3848 - 3853 (1977)

TAKAI, Y., NAKAYA, S., INOUE, M., KISHIMOTO, A., NISHIGAMA, K., YAMAMURA, H., & NISHIZUKA, Y.

Comparison of mode of activation of Guanosine 3',5' - monophosphate - dependent and adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinases from silkworm.

J. Biol. Chem. 251, 1481 - 1487 (1976).

TELFORD, M.

Changes in blood sugar composition during the molt cycle of the lobster  
Homarus americanus.

Comp. Biochem. Physiol. 26 , 917 - 925. (1968 a).

TELFORD, M.

Blood glucose in crayfish.

III. The source of glucose and role of the eyestalk factor in hyperglycemia  
of Cambarus robustus.

Comp. Biochem. Physiol. 51 B , 69 73. (1975).

TRAUSCH, G., & BAUCHAU, A.

Phosphorylation and dephosphorylation of purified pyruvate kinase isolated  
from the hépatopancreas of the lobster (Homarus americanus.)

Molecular Physiology 5 , 333 - 343 (1984).

VAN HERP, F., & STROLENBERG, G.E.C.M.

Functionnal aspects of the neurosecretory system in the eyestalk of the  
crayfish Astacus leptodactylus, with special reference to the hyperglycemic  
hormone.

Gen. Comp. End 40 , pp.364. Abstract n°144 (1980).

WALSH, D.A., PERKINS, J.P., & KREBS, E.G.

An adenosine 3',5' - monophosphate - dependent protein kinase from rabbit  
skeletal muscle.

J. BIOL. Chem. 243 , 3763 - 3765 (1968)

WALSH, D.A., ASHBY, C.D., GONZALES, C., CALKINS, D., FISCHER, E.H., & KREBS, G.  
Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5' -  
monophosphate - dependent protein kinases.

J. Biol. Chem. 246 , 1977 - 1985 (1971).

WANG, D.H., & SCHEER, B.T.

UDPG - glycogentransglucosidase and a natural inhibitor in crustacean tissues.

Comp. Biochem. Physiol., 9 , 263 - 274 (1963)

WELLER, M.

Protein phosphorylation.

The nature function, and metabolism of protein which contain covalently  
bound phosphorus. (1979).

WILLEMET, N.

Contribution à l'étude de kinases de protéines stimulées par l'AMP - cyclique et/ ou le GMP cyclique chez le homard Homarus americanus. (H. MILNE EDWARDS).

Mémoire de licence en Sciences Zoologiques F.N.D.P. (1981)

WOLFF, D.Y. & BROSTROM, C.O.

Adv. Cyc. Nuc. Res. 11, 28 - 288. (1979)

WIESER, W. , & LACKNER, R.

Multiple control of Helix pomatia pyruvate kinase by high -  $M_R$  modulators.

Febs letters. Vol. 138 n°2. ( February 1982).