

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise en évidence et rôle de la calmoduline dans le contrôle de l'osmorégulation branchiale chez le crabe Eriocheir sinensis H. Milne-Edwards

Robette, Etienne

Award date: 1988

Awarding institution: Universite de Namur

Link to publication

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Mise en évidence et rôle de la "calmoduline" dans le contrôle de l'osmorégulation branchiale chez le crabe *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards.

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

> > Etienne ROBETTE 1987-1988

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix Faculté des Sciences Rue de Bruxelles, 61, B - 5000 NAMUR Tél. : 081 / 22 16 98 Télex : 59222 facnam-b Téléfax : 081 / 230391

Mise en évidence et rôle de la "calmoduline" dans le contrôle de l'osmorégulation branchiale chez le crabe Eriocheir sinensis H. Milne-Edwards.

ROBETTE Etienne

Résumé.

Le travail met en évidence la présence de "calmoduline" au niveau de branchies de crabe Eriocheir sinensis . Nous pensons que cette protéine, liant le Ca²⁺, est capable de stimuler la pompe à Ca²⁺ et la phosphodiestérase de l'AMPcyclique dans les branchies antérieures et postérieures de ce crabe. L'utilisation d'antagonistes de la calmoduline, tels que la trifluopérazine et le calmidazolium, inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique de l'ATP, nous permet d'envisager la présence, dans les branchies postérieures uniquement, de "pompes à calcium" sensibles à la calmoduline.

Enfin, la mise en évidence, dans les branchies antérieures et postérieures, de PDEAMPC activées par la calmoduline soulève le rôle important que pourrait jouer cette molécule dans le contrôle du pool intracellulaire de l'AMPc.

Abstract.

The presence of calmodulin within the gills of the crab Eriocheir sinensis is demonstrated. This Ca²⁺ binding protein is though to be able to stimulate both the Ca²⁺ pump and the cAMP-dependent protein kinase in the anterior and posterior gills. The inhibitory action of calmodulin antagonists as trifluoperazin and calmidazolium on the enzymatic hydrolysis of ATP, allows us to postulate the presence of a calcium pump sensitive to calmodulin, this only for the posterior gills.

Finally, the identification in both types of gills of cAMP-phosphodiesterases activated by calmodulin brings forward the important function of this molecule for the control of the intracellular pool of cAMP.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques.

Septembre 1988.

Unité d'Endocrinologie et d'Hématologie comparées.

Promoteur : Prof. P. DEVOS

Je tiens tout d'abord à remercier le Révérend Père DEVOS pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à Monsieur G. TRAUSCH qui m'a suivi et conseillé tout au long de ce travail.

Je remercie également Madame M.-C. ANNET-FORGET et Mademoiselle M.-A. BENOIT pour leur continuel dévouement et leur disponibilité.

Merci à vous, Nathalie et Xavier de votre présence stimulante et de votre bonne humeur coutumière.

Je me dois aussi de remercier tous les autres membres de l'Unité d'Hématologie et d'Endocrinologie comparées qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

J'adresse une reconnaissance spéciale à Madame A.-C. TALLIER-CASSE qui s'est chargée de la dactylographie.

Enfin, je remercie mes parents, sans lesquels je n'aurais jamais pu réaliser ce travail.

Table des matières

Chapitre I : Introduction bibliographique

1.1. <u>La ca</u>	almoduline	
1.1.1 1.1.2 1.1.3 1.1.4 1.1.5 1.1.6 1.1.7	 Historique Structure de la calmoduline Propriétés physico-chimiques de la CaM Distribution de la calmoduline Les antagonistes des protéines liant le calcium Rôles physiologiques de la calmoduline CaM et PDE_{AMPc} dépendante 	1 2 4 6 7 9
1.2. <u>Osm</u>	orégulation et transport ionique chez les Crustacés	
1.2.1 1.2.2	 Introduction La branchie comme organe osmorégulateur Morphologie de la branchie Physiologie de la branchie Biochimie de la branchie 	18 18
1.2.3	8. Conclusions	24
1.3. <u>L'ion</u>	calcium et le transport calcique	
1.3.1 1.3.2	 Introduction Importance de l'ion calcium 1.3.2.1. Le signal calcium 1.3.2.2. Le calcium en tant que médiateur 1.3.2.3. Les pompes à Ca⁺⁺ 1.3.2.4. Les Ca⁺⁺ATPases Introduction Les Ca²⁺ATPases et les phosphatases alcalines 	25 26 27 30 31
1.3.3	 L'ion calcium et la calmoduline 1.3.1.1. Liaison du Ca²⁺ à la CaM 1.3.1.2. Modèle d'un transport actif de calcium à travers un épithélium branchial : rôle de la CaM 	34 34 35

Chapitre II : Orientation du travail

Chapitre III : Matériel et méthodes

3.1	. Introd	uction	
	3.1.1.	Présentation de l'animal Fractionnement subcellulaire de branchies	38
	0.1.2.	de crabe <i>Eriocheir sinensis</i>	39
3.2	. <u>Les di</u>	fférents dosages	
	3.2.1.	Dosage de protéines	42
		3.2.1.1. Principe	42
		3.2.1.2. Solutions	42
		3.2.1.3. Mode opératoire	42
	3.2.2.	Mise en évidence de la calmoduline	43
		3.2.2.1. Principe	43
		3.2.2.2. Solutions	44
		3.2.2.3. Mode opératoire	45
	3.2.3.	Mesure de l'hydrolyse de l'ATP	46
		3.2.3.1. Principe	46
		3.2.3.2. Solutions	46
		3.2.3.3. Mode opératoire	47
	3.2.4.	Dosage de la PDE _{AMPc}	48
		3.2.4.1. Rappel du principe	48
		3.2.4.2. Solutions	48
		3.2.4.3. Mode opératoire	48

Chapitre IV : Résultats

4.1.	Mise e	en évidence de la "calmoduline" au niveau de branchies	
	de cra	be Eriocheir sinensis	49
	4.1.1.	Matériel biologique utilisé	49
	4.1.2.	Contenu en protéines et distribution "subcellulaire"	50
	4.1.3.	Dosage de la CaM	51
4.2.	Activa	tion de l'hydrolyse de l'ATP par les ions Ca ²⁺ et Mg ²⁺	
	dans	la branchie de crabe <i>Eriocheir sinensis</i>	
	4.2.1.	Introduction	56
	4.2.2.	Stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par les ions calcium	56
		4.2.2.1. Introduction	56
		4.2.2.2. Résultats	57
	4.2.3.	Stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par les ions Mg ²⁺	59
	4.2.4.	Effets d'inhibiteurs sur l'hydrolyse du Ca~ATP ou Mg~ATP	61

37

4.2.4.1. Introduction	61
4.2.4.2. Effet de la théophylline	61
4.2.4.3. Effet de la cystéine	64
4.2.4.4. Effet de la trifluopérazine	66
4.2.4.5. Effet du calmidazolium	68
4.3. Mise en évidence de PDEAMPc dépendante du complexe Ca ²⁺ -CaM	
dans les branchies du crabe E. sinensis : effet de la calmoduline	
4.3.1. Introduction	71
4.3.2. Résultats	72
Chapitre V : Discussion et conclusions générales.	73

Bibliographie

Errata

- Liste des abréviations : *AMPc** =³-*AMPc* : *adénosine -3', 5'-monophosphate cyclique tritié* lire : AMPc* =³-AMPc : adénosine -3', 5'-monophosphate cyclique tritiée
- EGTA : éthylènebis (oxyéthylènenitrilo) tetraacétic acid lire : EGTA : ethylenebis (oxyethylenenitrilo) tetraacetic acid

p. 8	ligne 12	ATPases érythrocytaires dépendante lire : ATPases érythrocytaires dépendantes
	ligne 14	<i>membranes erythrocytaires</i> lire : membranes érythrocytaires
p. 24	ligne 9	<i>deux types d'épithélium</i> lire : deux types d'épithélia
p. 25	ligne 2	<i>des processus de transport indépendant</i> lire : des processus de transport indépendants
p. 28	ligne 3	<i>la plupart des kinases de protéine</i> lire : la plupart des protéines kinases
p. 54	ligne 6	lire : du glycérol dans la conservation
p. 57	ligne 14	<i>phosphatases alcalines des membranes</i> lire : phosphatases alcalines de membranes
p. 77	ligne 7	<i>"pompe à calcium"</i> lire "pompes à calcium"

Liste des abréviations

AANS	acide amino naphtol sulfonique
AC	adénylate cyclase
α-CG DH	α-cétoglutarate déshydrogénase
AMPc	adénosine-3', 5'- monophoshate cyclique
$AMP_{c}^{*} = H^{3}-AMP_{c}$	adénosine-3', 5'- monophosphate cyclique tritié
Å	angström
ATP	adénosine 5'- triphosphate
BA	branchies antérieures
BP	branchies postérieures
Ca ²⁺ -BP	protéine liant le calcium
Ca ²⁺ -CaM	complexe calcium-calmoduline
CDR	régulateur dépendant du calcium
CaM	calmoduline
CaM-BP	protéine liant la calmoduline
Ci	Curie
5'-AMP	adénosine 5'- monophosphate
DEAE-cellulose	diéthylaminoéthyl - cellulose
°C	degré Celsius
EGTA	éthylènebis (oxyéthylènenitrilo) - tetraacétic acid
Xg	expression de la force centrifuge (9,81 m/sec ²)
μg	microgramme
GMP _C	guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique
g	gramme
IP ₃	inositol-triphosphate
IDH	isocitrate déshydrogénase
Km	constante de Michaelis-Menten
μΙ	microlitre

μCi	microCurie
μM	micromolaire
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
min	minutes
М	molaire
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP+	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
nm	nanomètres
Ν	normal
PAF	facteur activateur de la PDE
PDE	phosphodiestérase
PDEAMPc	phosphodiestérase hydrolisant l'AMPc dépendante du complexe Ca ²⁺ - CaM
PDH	pyruvate déshydrogénase
Phén	Phénothiazine
Pi	phosphate inorganique
PM	poids moléculaire
RPM	tour / min.
SDS	sodium dodécyl sulfate
TCA	acide trichloracétique
TFP	trifluopérazine
TRIS	Tri - (Hydroxyméthyl) - amino - méthane

Chapitre I : Introduction bibliographique

1.1. La calmoduline

1.1.1. Historique

La découverte de la calmoduline, à la fin des années soixante, est le résultat d'un grand nombre de travaux scientifiques. On peut citer quelques pionniers :

- Wai Yiu Cheung (1970) fut le premier qui prouva l'existence d'un facteur activant la phosphodiestérase (PDE) dépendante de l'AMPcyclique.Cet activateur, présent dans un homogénat de cerveau de bovin non purifié, se sépare de la PDE par chromatographie sur une colonne de DEAE-cellulose; avant d'être placé sur la colonne, l'enzyme est actif, mais devient inactif après élution; les fractions obtenues en début d'élution renferment beaucoup de calmoduline (CaM) à l'inverse des dernières fractions qui ne contiennent plus d'activateur (Cheung 1969, 1971a).
- Teo et Wang démontrent en 1973 que la calmoduline est une protéine capable de fixer le calcium (CA.BP). Ces résultats expliquent les observations de Kakiuchi et Yamazaki (1970) qui constatent que la calmoduline accroît la sensibilité de la phosphodiestérase au calcium.

Le fait que la calmoduline régule une grande variété de fonctions cellulaires et que la recherche menant à l'identification de ces fonctions a été réalisée dans plusieurs laboratoires a naturellement conduit à l'utilisation de nombreuses désignations pour parler de la "calmoduline" : facteur activant la PDE (P.A.F.), protéine activatrice, protéine modulatrice, récepteur de calcium, protéine troponine C-like, régulateur dépendant du calcium (CDR), et finalement calmoduline. Ce dernier terme a été définitivement retenu car il montre bien que la protéine est modulée par le calcium et qu'elle régule aussi la concentration en calcium (Cheung et al., 1978).

1.1.2. Structure de la calmoduline

La structure primaire de la molécule est constituée de 148 acides aminés, dont la séquence a été déterminée par Vanaman et al. (1977) et par Watterson et al. (1980). En 1976, Kretsinger avait déjà proposé un modèle structural pour la calmoduline : il y aurait 4 domaines pouvant lier l'ion calcium, chacun consistant en une boucle de 12 acides aminés flanquée de chaque côté par une hélice résiduelle de 8 acides aminés (fig. 1). Les 4 segments liant le calcium sont appelés "poignée EF" et correspondent aux résidus 20-31, 56-67, 93-104, 129-140. Il existe une homologie très étroite entre les domaines I-III et II-IV, ce qui suppose que la calmoduline pourrait résulter de 2 duplications successives d'un gène initial codant pour un domaine liant le calcium.

fig. 1.



La structure tridimentionnelle de la calmoduline de cerveau de bovin a été déterminée par cristallographie à fine résolution. On s'aperçoit que la molécule est constituée de 2 lobes globulaires liés par une longue hélice α : chaque lobe peut lier 2 ions Ca⁺⁺ par l'intermédiaire de domaines en boucle. La longue hélice interlobaire peut intervenir dans les interactions entre la CaM et les médicaments, ou entre la calmoduline et d'autres protéines (voir point 1.1.5. de l'introduction).

La structure de la calmoduline a été beaucoup étudiée chez les vertébrés : citons uniquement les travaux de Grand et Perry (1978) sur le muscle lisse utérin de bovin et les travaux de Dedman et al. (1978) sur les testicules de rat. En 1979, Jones et al. démontrent que la séquence en acides aminés de la calmoduline du coelentéré *Renilla reniformis* est quasiment identique à celle de la CaM du cerveau de bovin. Quant à Waisman et ses collaborateurs, ils se sont intéressés à la structure de la calmoduline du ver de terre *Lumbricus caenorhabditis elegans*. Il se dégage de ces études une grande similitude structurale entre la calmoduline des vertébrés et d'invertébrés, et donc une conservation structurale de cette molécule protéique au cours de l'évolution.

Pour tous les travaux observés, on a découvert une molécule de triméthyllysine en position 115 sur la calmoduline (voir fig. 1) et dont le rôle dans l'activité biologique de la protéine n'a pas encore été élucidé. Il est étrange que la calmoduline du lépidoptère *Bombyx mori* ne possède pas de triméthyllysine; cela soulève la question de connaître la signification fonctionnelle de cet acide mais également la situation phylogénétique des calmodulines dépourvues de triméthyllysine (Morishima et Bodnaryk, 1985). Des protéines structurales CaM-like ont été trouvées chez les plantes (Anderson et Cormier, 1979; Wallace et Cheung, 1979), ainsi que chez les protozoaires (Kuznicki et al., 1979) : en 1979, Jamieson et al. ont étudié en détail le cilié *Tetrahymena pyriformis*.

La composition de la calmoduline montre, comme chez les vertébrés, l'absence de tryptophane et de cystéine ainsi que la présence de triméthyllysine.

Notons qu'il existe une relation structurale étroite entre la CaM et la troponine C

(de muscle cardiaque et squelettique). Ces 2 molécules font partie d'une famille de protéines pouvant lier le calcium (grâce à leurs domaines en boucle) tout comme la protéine S100, la parvalbumine, la protéine intestinale liant le calcium et la myosine kinase.

1.1.3. Propriétés physico-chimiques de la CaM

La calmoduline a un poids moléculaire de 16273 (Vanaman et al., 1977), possède un point isoélectrique de 4,3; la présence de nombreux résidus aspartate et glutamate (entre 30 et 50 %) en fait une molécule "acide". Ce récepteur du calcium ne possède pas de cystéine, de tryptophane, ni d'hydroxyproline, ce qui lui assure une structure tertiaire fort flexible, indispensable pour l'interaction avec les récepteurs protéiques. La propriété la plus remarquable de la calmoduline est sa thermostabilité. En effet, Cheung, en 1969, a démontré qu'elle conserve sa structure à 95°C; c'est là un moyen qui permet de séparer la calmoduline et les protéines liant la CaM qui elles, sont thermolabiles. De plus, la calmoduline résiste à des solutions d'urée 9 M.

Une autre caractéristique fondamentale de la CaM est son ubiquité : elle est présente chez tous les eucaryotes; elle n'a pas de spécificité d'espèce. De plus, elle ne possède pas de spécificité de tissu. Notons aussi que la calmoduline possède des propriétés spectroscopiques particulières : un rapport thyrosine-phénylalanine faible donne un spectre d'absorption avec un maximum de 276 nanomètres, et de nombreux pics (à 253 nm, 258,5 nm, 265 nm, 268,5 nm) caractéristiques de la phénylalanine.

Les protéines ayant la capacité de lier la calmoduline sont nommées CaM-BP. Ce sont la PDE dépendante de l'AMPcyclique, l'adénylate cyclase, la (Ca²⁺⁻Mg²⁺)ATPase (Gopinath et Vincenzi, 1977; Jarrett et Penniston, 1977; Sobue et al., 1979), la myosine kinase, la protéine kinase de membrane dépendante de la CaM (Schulman et Greengard, 1978, a, b), la calcineurine.

La calcineurine, ou CaM-BP₈₀, est un de ces enzymes : il inhibe certains enzymes régulés par la calmoduline, notamment

- l'adénylate cyclase de cerveau (Wallace et al., 1978; Wescott et al., 1979)
- la (Ca²⁺ + Mg²⁺)ATPase d'érythrocyte (Larsen et al., 1978)
- la myosine kinase (Waisman et al., 1978, a)
- le transport calcique (CaM dépendant) à travers la membrane érythrocytaire.

La calcineurine possède 2 sous-unités dont le total des poids moléculaires atteint 80.000, d'où son nom (CaM-BP₈₀). On notera qu'il existe aussi une CaM-BP₇₀ qui, elle, est thermostable et monomérique.

La biochimie de la calcineurine est bien connue; c'est une molécule thermostable, agissant de façon antagoniste avec la calmoduline dans son interaction de la PDE dépendante de l'AMPcyclique (voir figure 2).

fig. 2. (1)
$$Ca^{2+} + CaM \rightleftharpoons Ca^{2+} CaM \rightleftharpoons Ca^{2+} - CaM^*$$

(2) $Ca^{2+} - CaM^* + PDE \rightleftharpoons Ca^{2+} - CaM^* \rightleftharpoons Ca^{2+} - CaM$
PDE PDE*
(3) $Ca^{2+} - CaM^* + CaM - BP_{80} \rightleftharpoons Ca^{2+} - CaM^* - CaM - BP_{80}$

(1) L'astérisque marque la forme biologique activée du complexe Ca²⁺- CaM. Les réactions (2) et (3) soulignent l'importance du complexe activé dans la stimulation de la PDE et de la CaM-BP₈₀. L'inhibition de l'effet activateur de la CaM sur la PDE est élevé quand la concentration en calmoduline est faible, et inversément.

Ces molécules protéiques purifiées possèdent toutes un seul type de sous-unité qui porte l'activité catalytique ainsi que la possibilité de lier la calmoduline. La similitude dans le mécanisme d'activation de ces différents enzymes est bien en faveur de l'unicité de ce site.

1.1.4. Distribution de la calmoduline

La calmoduline se retrouve chez tous les eucaryotes; elle ne possède pas de spécificité d'espèce, ni de tissu. Ainsi, de la calmoduline a été trouvée chez les protozoaires; Lin et al., en 1986, montrent l'existence de la CaM en différents endroits de plantes supérieures, notamment dans les cellules de la coiffe d'une racine de maïs, dans les éléments du métaxylène, dans les cellules corticales. La calmoduline est également présente chez les porifères, ainsi que dans les muscles d'invertébrés marins comme les coquilles Saint-Jacques et l'anémone de mer (Yazawa et al., 1980).

La CaM a été localisée chez les némathelminthes, et chez le ver de terre *Lumbricus terrestris* (Waisman et al., 1978). De Couet et al., en 1986, montrent l'existence de la CaM associée aux microvillosités des photorécepteurs rhabdoméraux d'arthropodes. Wright et Cook (1985) examinent 11 échantillons tissulaires de différents insectes : la CaM est présente dans les différents tissus, mais sa concentration varie selon le type de tissu.

En 1977, Dedman et al. isolent la calmoduline à partir de testicules de rat. Rochette-Egly et al. (1986) font de même à partir d'épithélium intestinal de rat. Le cerveau de bovin (Lin et al., 1974; Watterson et al., 1976; Wolff et al., 1977) ou de porcin (Wolff et Siegel, 1972; Klee, 1977) sont aussi une source de calmoduline. Le coeur (Teo et al., 1973) et l'utérus de bovin (Grand et Perry, 1978) en contiennent également.

La calmoduline se retrouve également dans la plupart des fractions subcellulaires. Généralement, la fraction cytoplasmique contient des quantités importantes de calmoduline; alors que les fractions nucléaires, mitochondriale et microsomale en contiennent moins (Egrie et al., 1977, Gnegy et al., 1977). Une exception cependant : Smoake et al., en 1974, ont montré que la fraction mitochondriale du foie ne contient pas de calmoduline. Bref, les études sur la distribution de la CaM sont très nombreuses et reflètent toutes le manque de spécificité d'espèce et de tissu de la calmoduline.

1.1.5. Les antagonistes des protéines liant le calcium

Parmi les nombreux antagonistes de la calmoduline, on retrouve beaucoup d'antipsychotiques tels que les phénothiazines, les butyrophénones, les thioxanthènes et les diphénylbutylpipéridines. La théophylline et la papaverine, les amphétamines, le pentobarbital et la morphine peuvent "bloquer" des effets "calmoduline-dépendant". Deux antagonistes ont retenu plus particulièrement notre attention : la trifluopérazine (TFP) et le calmidazolium. Les caractéristiques de la liaison de la tripfluopérazine à la calmoduline ont été décrites pour la première fois par Levin et Weiss en 1977. Ils ont, dans un premier temps, montré l'importance de l'ion calcium dans cette liaison : à faible concentration en TFP (< 1µM), il y a peu ou pas de liaison en absence de calcium. La liaison augmente si on ajoute du calcium dans la solution. Une concentration plus élevée de l'antagoniste (de 1 à 100µM) favorise la liaison CaM -TFP. D'autres ions bivalents peuvent promouvoir cette liaison : Si²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺. Remarquons que le mécanisme de liaison TFP - Ca²⁺ est dépendant du pH (Levin et Weiss, 1977), et est réversible par chélation du Ca²⁺ avec l'EGTA. Cette liaison se produirait par l'intermédiaire de 2 sites situés sur le CaM : le premier site serait situé entre le domaine II et III (revoir figure 1). Le second serait placé à proximité du domaine IV (Klevit et al., 1981). La figure 3 présente le mode d'action de cet antagoniste antipsychotique de la calmoduline.

fig. 3. $CaM + Ca^{2+} \rightleftharpoons CaM \cdot Ca^{2+} \rightleftharpoons CaM - Ca^{2+} \cdot Enz \rightleftharpoons CaM \cdot Ca^{2+} \cdot Enz^{**}$ 11 $CaM \cdot Ca^{2+} \cdot Phén$ 11 $CaM \cdot Ca^{2+} \cdot Phén \cdot Enz (inactif)$

L'astérisque marque la forme biologique activée du complexe; la double astérisque fait de même pour le complexe ternaire. Le modèle montre que la phénothiazine (Phén) se lie bien au complexe Ca⁺⁺- CaM pour ensuite entrer en contact avec l'enzyme, mais est incapable d'activer l'enzyme en question (voie verticale). En absence de phénothiazine (voie horizontale), la calmoduline subit un changement de conformation suite à la fixation du Ca⁺⁺ qui permettra la formation d'un complexe ternaire actif (comprenant l'enzyme). Ce modèle a été proposé par Gietzen et ses collaborateurs en 1980. L'effet antagoniste de la trifluopérazine (TFP) est largement utilisé pour mettre en évidence un effet de la calmoduline, par exemple, sur la Ca⁺⁺ ATPase de haute affinité pour le calcium (Flik et al., 1984).

Le calmidazolium, appelé aussi R24571, est un inhibiteur spécifique des enzymes dépendant de la calmoduline (dont la Ca⁺⁺ATPase). Le R24571, extrêmement lipophile, est un composé de synthèse dont la structure est reprise à la figure 4.

Fig. 4.



Cette phénothiazine, comme les butyrophénones et la vinblastine, par liaison à la calmoduline, inhibent la fraction des ATPases érythrocytaires dépendante de la calmoduline (Gietzen et al., 1981). Le R24571 est largement utilisé pour distinguer les différentes activités "ATPases" de membranes erythrocytaires : ainsi, la Ca⁺⁺ATPase dépendante de la calmoduline possède une affinité 40 fois plus élevée pour l'inhibiteur que la Mg⁺⁺ATPase. La Na⁺K⁺ ATPase, quant à elle, est très peu inhibée même à très

haute concentration en calmidazolium. Il a aussi été montré que le R24571 peut inhiber l'activation de la PDE de cerveau CaM dépendante et de façon plus spécifique que la TFP. D'autres auteurs utilisent des phénothiazines différentes : la chlorpromazine (Hidaka et al., 1979), le W7 (Kobayashi et al., 1979) qui est un relaxant musculaire ...

1.1.6. Rôles physiologiques de la calmoduline

La calmoduline est une molécule contrôlant un ensemble de processus cellulaires qui tiennent compte de l'interaction de protéines et des ions Ca^{2+} : ainsi, la CaM régule le niveau des nucléotides cycliques par activation de la PDE_{AMPc} et par stimulation de l'adénylate (et guanylate) cyclase : elle intervient par exemple dans la régulation de l'activité des récepteurs dopaminergiques. Contrairement à la PDE CaM dépendante située dans le cytoplasme, l'adénylate cyclase est associée à la membrane cellulaire, comme le montre la figure 5.

fig. 5.



Piascik et al. (1980) ont montré que la sensibilité des 2 enzymes au calcium diffère durant la phase initiale de l'influx calcium, de faibles concentrations en calcium activent l'adénylate cyclase (AC). Quand la concentration en calcium cytosolique s'élève, cet ion devient inhibiteur pour l'adénylate cyclase alors qu'il active la

phosphodiestérase, ramenant le niveau d'AMPc intracellulaire à son niveau d'équilibre.

Comme la calmoduline est un médiateur de l'adénylate cyclase et de la PDE, elle fournit un lien moléculaire entre les messagers AMPc et Ca⁺⁺. Alors que les hormones permettent la communication extracellulaire, l'AMPc et le calcium permettent la communication entre les organites intracellulaires. La figure 6 illustre bien l'interaction entre les deux voies.





Les interrelations notées 1 et 2 rappellent que le complexe actif CaM.Ca⁺⁺ régule la PDE et l'adénylate cyclase. Les flèches en pointillé signalent les relations encore mal définies aujourd'hui (relation récepteur phosphorylé - Ca⁺⁺ et complexe ternaire CaM - Ca⁺⁺ - récepteur - hormone).

La calmoduline contrôle aussi la motilité cellulaire en activant la myosine kinase et en stimulant l'assemblement ou la désorganisation des microtubules. La plupart des cellules eucaryotes contiennent de l'actine et de la myosine, protéines responsables de la motilité cellulaire; l'actomyosine est contrôlée par les niveaux de calcium dans les cellules musculaires et non musculaires. La figure 7 permet de mieux comprendre la régulation de la contraction des muscles lisses par le couple Ca⁺⁺ - CaM et par l'AMPcyclique.





Le complexe actif Ca⁺⁺ - CaM myosine kinase catalyse la phosphorylation de la myosine (voir a.), convertissant la myosine de muscle lisse en une forme capable d'entraîner l'activation de l'actine. Une phosphatase, qui ne dépend pas du calcium pour être active, reforme la myosine sous sa forme non phosphorylée (voir b.). La phosphorylation de la myosine kinase résulte d'une diminution de la capacité de la kinase à lier la calmoduline (voir c.).

L'autoassemblage de la tubuline en microtubules requiert la participation d'une protéine de structure auxiliaire nommée Tau. A de faibles concentrations en calcium, Tau est libre de s'associer à la tubuline et l'assemblage des microtubules peut avoir lieu. De plus hautes concentrations empêchent l'assemblement par le mécanisme suivant : les ions calcium se lient à la CaM, et le complexe formé se lie ensuite à Tau, la rendant ainsi indisponible pour s'associer à la tubuline. La capacité de Tau à promouvoir l'assemblage des microtubules est soumis à une modulation supplémentaire : la phosphorylation de Tau (Lindwall et Cole, 1984).

La calmoduline intervient également dans la régulation d'autres voies métaboliques : ainsi, l'enzyme clé contrôlant la mobilisation du glygogène, la glycogène phosphorylase kinase, est constituée de 4 sous-unités dont la sous-unité δ , qui n'est autre que la CaM.

La figure 8 montre que la phosphorylase kinase, activée par la présence de la Ca⁺⁺, ajoute des groupements phosphate à la phosphorylase b inactive. Cette dernière est alors activée à son tour, et se nomme alors phosphorylase a. C'est cette seconde phosphorylase activée qui conduit à la dépolymérisation du glycogène.

Fig. 8.



Dans le cas de la synthase, la CaM en présence de calcium, en activant la glycogène synthase kinase, provoque une phosphorylation de cette synthase qui inactive cette fois l'enzyme, ce qui conduit à la polymérisation du glucose, le rendant ainsi inutilisable en tant que source d'énergie pour la contraction musculaire.

Muto et Miyachi (1977) montrent que de la NAD kinase de plante (molécule chargée du contrôle des niveaux de NADP⁺), partiellement purifiée, est activée par une molécule thermostable et très acide. En 1978, Anderson et Cormier accumuleront assez d'évidences pour affirmer que la NAD kinase de plante est activée par la CaM et non pas par un autre activateur. Ainsi, ils montrent qu'il existe des similitudes entre les propriétés de cette protéine activant la NAD kinase et la calmoduline de cerveau de bovin, prouvent que cette activation par ce facteur protéique dépend du calcium et que ce facteur peut aussi activer le PDE de cerveau de porcin.

La calmoduline intervient également dans la synthèse des neurotransmetteurs : la dopamine, la norépinéphrine et l'épinephrine sont synthétisées à partir d'un acide aminé, la tyrosine, et ce, en plusieurs étapes :



La première étape est catalysée par un enzyme, la tyrosine hydroxylase. Yamauchi et Fujizawa (1979) ont montré que l'activité catalytique de cet enzyme est fonction d'une phosphorylation régulée par une kinase dépendante de la CaM.

La tryptophane hydoxylase, qui catalyse la conversion du tryptophane en 5-hydroxytryptophane pour donner la sérotonine, est également contrôlée par une phosphorylation dépendante de la calmoduline.

Schulman et Greengard (1978b) ont isolé une préparation cytosolique à partir de cortex cérébral de bovin afin d'identifier les différents activateurs de la protéine kinase. Ils ont testé la capacité des fractions obtenues à stimuler la phosphorylation de protéines Ca⁺⁺ dépendantes : un seul pic d'activation de la kinase a été obtenu, suggérant qu'une seule protéine cytosolique est capable de reconstituer l'activité de la protéine kinase dépendant du calcium. Les mêmes fractions ont été examinées dans le but de détecter la présence de CaM; ils ont constaté que la présence de CaM coïncide exactement avec le pic d'activation de la kinase Ca⁺⁺ dépendante. Un gel d'électrophorèse "SDS-polyacrylamide" révèle un polypeptide de 18000 daltons, ce qui suggère que l'activateur endogène du système de phosphorylation protéique "Ca⁺⁺ dépendant" est bien la calmoduline.

La membrane plasmique érythrocytaire possède un système transporteur responsable de l'extrusion du calcium de la cellule; cet enzyme est la $(Ca^{++} + Mg^{++})$ ATPase ou pompe à calcium, qui maintient le niveau de calcium intracellulaire libre autour de $\pm 10^{-7}$ M. Cet enzyme présente une activité maximale lorsque la CaM est liée à sa surface cytoplasmique. C'est une propriété unique de la pompe à calcium de la membrane plasmique : c'est le seul système protéique transporteur connu qui interagit directement avec la CaM et un des rares enzymes "Ca⁺⁺ dépendants" qui peut contrôler sa propre activité en affectant le transport du calcium.

En plus des actions déjà mentionnées, la calmoduline stimule l'activité de la phospholipase A2 dans les plaquettes (Wong et Cheung, 1979). Elle paraît aussi jouer un rôle dans la sécrétion intestinale (Ilundain et Naftalin, 1979) et la sécrétion

d'insuline (Sugden et al., 1979).

En 1988, Arellano et al. ont montré, à partir d'axones latéraux d'écrevisses, que la calmoduline agit comme intermédiaire pour les effets du calcium sur les gap junctions. Récemment, Orosz et al. (1988), étudiant l'effet de médicaments sur l'interaction entre la CaM et les enzymes glycolytiques, montrent que la CaM module la formation d'un agrégat de phosphofructokinase (PFK).

1.1.7. CaM et PDE AMPc dépendante

Le mode d'action d'un certain nombre d'hormones et de neurotransmetteurs fait souvent intervenir des variations de concentration intracellulaire de nucléotides cycliques et/ou des ions calcium. Le système PDE_{AMPc} est un composant fondamental et détermine, avec les adénylates cyclases, l'intensité et la durée des réponses des nucléotides cycliques.

Il existe de nombreux types de phosphodiestérases; certaines sont dépendantes du GMPc, d'autres de l'AMPc : (ce sont des CNPDE); parmi celles-ci, l'A₁PDE possède une haute affinité pour l'AMPc et est indépendante de la CaM et du Ca⁺⁺. Les deux autres formes majeures de la PDE, nommées G₁A et G₂A - PDE, hydrolysent aussi bien l'AMPc que le GMPC avec une faible affinité. La G₂A - PDE est très sensible au Ca⁺⁺ et non stimulable par la calmoduline. L'activité G₁A - PDE est stimulée en présence de Ca²⁺, par la calmoduline, mais n'est pas affectée par le Ca⁺⁺ seul. Ce système peut être un site important pour la coordination et l'intégration de mécanismes contrôlés par le calcium et les nucléotides cycliques : par exemple, cette PDE AMPc dépendante accroît le "turn over" de l'AMPc intracellulaire et active les protéines kinases dépendantes de l'AMPc.

L'activité catalytique de la PDE dépendante du Ca²⁺ requiert la présence de Mg^{2+} et du Ca²⁺ pour être stimulée par la CaM (Kakiuchi et al., 1971; Teo et Wang, 1973). L'activation Ca²⁺ dépendante de PDE par la CaM est réversible (Cheung, 1971, b; Wolff et Brostrom, 1974; Lin et al., 1975). L'interaction entre la CaM et la PDE

a été mise en évidence par chromatographie sur tamis moléculaire : sans EGTA mais en présence de Ca⁺⁺, la PDE forme un complexe avec la CaM. Ce complexe se dissocie si on ajoute l'EGTA.

Fig. 9. $Ca^{2+} + CaM \implies Ca^{2+} - CaM^*$ $Ca^{2+} - CaM^* + PDE \implies Ca^{2+} CaM^* PDE^*$

Comme le montre le modèle de Lin et al. (1974, b) dans la figure 9, une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium de 10^{-7} à 10^{-5} M induit la formation d'un premier complexe actif Ca²⁺-CaM*, qui réagit ensuite avec l'apoenzyme de la PDE pour produire un holoenzyme activé. Le complexe ternaire est dissocié quand la concentration en calcium intracellulaire diminue, l'activité enzymatique retrouve alors sa valeur initiale. On perçoit le rôle important de ce second messager dans le contrôle de l'activité enzymatique de la PDE : le pool des nucléotides cycliques est aussi sous le contrôle des modifications du flux de Ca²⁺.

Une comparaison de la stimulation de la PDE par la CaM et par la trypsine peut nous éclairer sur la structure moléculaire de la PDE. La première stimulation (par la CaM) est réversible et produit une molécule biologiquement active, alors que la trypsine entraîne une protéolyse irréversible et désactivante (cfr figure 10). La liaison de la CaM à l'enzyme permet à celui-ci d'adopter une nouvelle conformation où le rôle catalytique est plus accessible au substrat.

Fig. 10.



Une protéolyse limitée de l'enzyme purifié permet de tirer l'hypothèse que la PDE AMPc est composée d'au moins 2 domaines fonctionnels : un domaine catalytique, qui lie le substrat AMPc, et un second domaine régulateur liant la CaM. Ce second domaine exerce une influence inhibitrice sur le domaine catalytique en absence de calmoduline.

Remarquons également que ce phémonème d'activation protéolytique, dépendant de la CaM, se retrouve au niveau de la myosine kinase, la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPase et la NAD kinase.

Bien que les forces thermodynamiques majeures responsables de la stabilisation du complexe CaM . protéine soient hydrophobes, la spécificité de ces interactions est dictée par des interactions polaires ou de charge. Les expériences montrent que des molécules hydrophobes variées peuvent se lier à la CaM de façon Ca⁺⁺ sensitive et jouer aussi un rôle antagoniste dans la liaison de la CaM aux CaM - BP. La figure 11 illustre cette remarque, avec la PDE comme CaM - BP.

Fig. 11.



1.2. Osmorégulation et transport ionique chez les Crustacés

1.2.1. Introduction

Les Crustacés euryhalins peuvent supporter les variations de salinité de leur environnement : ces Crustacés sont soit osmoconformères, soit hyperosmorégulateurs ou hyper-hypoosmorégulateurs; on retrouve chez presque tous les modèles connus de la régulation osmotique de l'hémolymphe. Le contrôle de l'osmolalité de l'hémolymphe des Crustacés résulte essentiellement du contrôle de la concentration en NaCI. Cette régulation implique des mouvements passifs et actifs de Na⁺ et Cl⁻ entre les fluides intra et extracellulaire et le milieu environnant. Ceci soulève la question de savoir quels sont les mécanismes qui interviennent dans le mouvement de ces ions et quelles sont les structures impliquées dans ces processus. Deux types de mécanismes contrôlent la concentration en NaCI de l'hémolymphe :

- des mécanismes "limitants", agissant sur les propriétés de perméabilité des structures épithéliales afin de minimiser les mouvements diffusionnels des ions.
- des mécanismes "compensatoires", dirigeant les mouvements actifs d'NaCl pour contrebalancer les flux de diffusion.

Depuis les travaux de Krogh (1938), la prise active de NaCI au niveau de la branchie a été considérée comme prenant une part essentielle dans la régulation de l'osmorégulation chez des espèces aquatiques hyper-régulatrices. Les mécanismes prenant part à cette régulation impliquent un transport indépendant de Na⁺ et de Cl⁻. Krogh (1939), en considérant différentes quantités d'anions et de cations, postule que l'électroneutralité peut être maintenue par un transport opposé de NH₄⁺ (ou H⁺) pour le sodium et de HCO₃⁻ pour le chlorure (voir aussi Shaw, 1960).

1.2.2. La branchie comme organe osmorégulateur

Morphologie de la branchie

Depuis les expériences de Koch (1934), la fixation à l'argent est utilisée pour

localiser les régions de la cuticule d'arthropodes qui sont perméables aux ions Cl⁻. Cette technique, reprise dans le cadre de l'étude des Crustacés, a finalement conduit à l'identification de l'épithélium branchial comme site premier de la régulation ionique de l'hémolymphe (Koch, 1934; Copeland, 1968; Barra et al., 1983). En 1983, Barra et al. ont montré que, chez le crabe chinois *Eriocheir sinensis*, seules les 3 paires de branchies postérieures présentent une fixation à l'argent. De tels résultats laissaient entrevoir la possibilité de différences structurales entre les branchies antérieures (BA) et les branchies postérieures (BP), ces différences pouvant être reliées à des différences fonctionnelles. Gilles et Péqueux (1981), en examinant les BA et les BP en microscopie électronique, ont d'ailleurs confirmé cette hypothèse.

- l'épithélium des lamelles branchiales des BP est épais (10 μm ou plus), contrairement à celui des BA (2 à 4 μm au maximum)
- la cuticule des BP est plus fine que celle des BA (0,3 μm pour 1 μm).

La figure 12 montre l'ultrastructure des cellules épithéliales issues des lamelles branchiales d'*Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce (agrandissement = X 23150).

Fig. 12.



en A : branchie antérieure C = surface cuticulaire BI = mb basale épaisse soulignant la lacune hémolymphatique (L) inf. m = mitochondrie en B : branchie postérieure AF = replis extensibles des mb apicales Bi = interdigitations des mb basales et basolatérales en étroit contact avec les mitochondries (m)

n = noyau

La figure 13 reprend schématiquement les éléments de la fig. 12. Soulignons d'une part la localisation et le nombre de mitochondries dans les branchies antérieures et postérieures, d'autre part les invaginations aux faces apicale et basale de la cellule.

Fig. 13.



<u>En A</u> : branchie antérieure g = glycogène sd = desmosomes septaux <u>En B</u> : branchie postérieure

ss = espace sous-cuticulaire

Dans les branchies antérieures, les noyaux des fines cellules épithéliales font généralement saillie à l'intérieur de l'espace hémolymphatique. Le côté des cellules apicales au dessous immédiat de la cuticule possède très peu de replis, ce qui rend le compartiment extracellulaire en dessous de la cuticule assez limité. De plus, la quantité d'organelles intracellulaires est très réduite. En conclusion, dans le cas du crabe *Eriocheir sinensis*, acclimaté à l'eau douce, les éléments morphologiques suggèrent que la branchie antérieure possède uniquement un épithélium de type respiratoire.

Pour les crabes acclimatés aux milieux dilués, les BP sont caractérisées essentiellement par un ensemble complexe et bien développé de replis apicaux évaginés et digités. Ces replis membranaires produisent sous la cuticule un large compartiment extracellulaire qui leur est caractéristique. Il y a de profonds replis basolatéraux venant se mettre en contact étroit avec la membrane des mitochondries. Les mitochondries peuvent devenir très abondantes et même remplir complètement l'espace cytoplasmique à l'intérieur ou au dehors de ces replis.

Bien que quelques détails varient d'un organisme à l'autre, une structure, similaire à celle décrite dans l'épithélium des branchies postérieures, peut être mise en évidence dans les branchies de nombreux autres Crustacés osmorégulateurs (Bielawski, 1971; Bulger, 1963; Copeland, 1968).

Physiologie de la branchie.

Il a été établi que les flux de Na⁺ dans les branchies antérieures du crabe euryhalin *Eriocheir sinensis* sont essentiellement passifs; cependant, l'étude sur branchies isolées et perfusées des flux ioniques en fonction de la concentration externe en Na⁺ montre que les mouvements de Na⁺ à travers l'épithélium des BA ne sont pas dus à un simple phénomène de diffusion mais plutôt régulés par des transporteurs (Péqueux et Gilles, 1981). La perméabilité au sodium dans les BA diminue à des faibles concentrations en sodium extracellulaire; c'est particulièrement intéressant pour un crabe qui doit limiter la perte en sels lors de son adaptation à de faibles salinités. Dans les branchies postérieures, les mouvements de l'ion Na⁺ sont décrits essentiellement comme étant contrôlés par des mouvements actifs (Péqueux et Gilles, 1981). Ce transport de Na⁺ est souvent lié au transport et au métabolisme de l'ion NH₄⁺.

En 1960, Shaw a montré que chez l'écrevisse, la production de NH_4^+ varie avec la salinité du milieu d'acclimatation et qu'il existe une relation entre l'influx de Na^+ et les mouvements de NH_4^+ dans la direction opposée d'une part et la concentration du milieu environnant d'autre part. L'idée est renforcée par le fait qu'une augmentation de NH_4^+ se produit durant l'acclimatation à des milieux dilués (Gérard et Gilles, 1972). Les résultats obtenus par Péqueux et Gilles (1978, 1981) sur les branchies isolées et perfusées d'*Eriocheir sinensis* soutiennent aussi l'idée qu'un couplage entre les mouvements de NH_4^+ et de Na^+ peuvent se produire dans les branchies postérieures. L'influx de Na^+ s'explique essentiellement soit par un système électrogénique, soit par tout autre système d'échange où les ions H⁺ seraient des candidats potentiels pour l'échange Na^+/H^+ .

Biochimie de la branchie.

Voici déjà plus de 20 ans qu'il est prouvé que les besoins énergétiques nécessaires pour l'acclimatation à différents milieux dépendant essentiellement du métabolisme oxydatif lui-même fonction de la consommation d'oxygène (voir Schoffeniels et Gilles, 1970); dans la plupart des cas, l'acclimatation à une salinité réduite induit une augmentation de la consommation d'oxygène et une augmentation du métabolisme oxydatif. Une augmentation de ces activités métaboliques est la conséquence d'une demande d'énergie accrue, elle-même liée à une augmentation de l'activité des processus de transport. On sait par exemple que la guantité d'ATP intracellulaire ainsi que son "turn over" varie avec l'origine des branchies isolées à partir du crabe bleu Callinectus sapidus (Engel et al., 1975). Wanson et al. (1983) ont montré que, pour les crabes Eriocheir sinensis acclimatés à l'eau de mer, une quantité significativement plus élevée d'adénylates était mesurée dans les branchies postérieures; c'est l'inverse pour l'acclimatation aux milieux dilués; en outre, on observe une diminution de la charge énergétique, conséquence d'une augmentation importante du contenu en 5'-AMP lors d'un stress osmotique. L'utilisation d'ATP dépasse sa production dans les BP de ce crabe. Cette conclusion renforce l'idée que les BP d'Eriocheir sinensis adapté à l'eau douce peuvent prendre activement le Na+ et utilisent largement le pool intracellulaire en ATP, qui lui-même dépend essentiellement du métabolisme des acides aminés.

Plusieurs évidences supportent l'idée que le transport actif de Na⁺ est étroitement lié à l'activité enzymatique de la (Na⁺ K⁺) ATPase. La présence de cette activité (Na⁺ K⁺)ATPase dans les branchies de crabe a été démontrée par plusieurs auteurs (Neufeld et al., 1980; Péqueux et al., 1983; Towle et al., 1976). Chez *Eriocheir sinensis*, une activité (Na⁺K⁺) ATPase élevée caractérise l'épithélium branchial de type transporteur et le niveau de l'activité est fonction du type de branchies considéré (Péqueux et al., 1984) : l'activité (Na⁺K⁺) ATPase est plus élevée dans les BP que dans les BA; on a pu prouver que cette différence d'activité entre les BA et les BP n'est pas la conséquence d'une différence dans la structure de l'enzyme : elle peut s'expliquer si l'on envisage que l'épithélium des BP possède plus de "sites de transport". Ces sites se retrouvent dans la partie basolatérale de la cellule épithéliale et on se souviendra que le nombre de plissements dans les BP est bien plus élevé que celui des BA.

Une acclimatation des crabes *Eriocheir sinensis* à des salinités réduites provoque une augmentation importante de l'activité enzymatique de la (Na^+K^+) ATPase uniquement dans les branchies postérieures. On sait nettement que les propriétés transportrices de Na⁺ de la face basolatérale de la cellule épithéliale dépendent de la présence, de la structure et de l'environnement qui entoure la (Na^+K^+) ATPase. Cette augmentation est liée à la mise en place progressive (3 à 8 jours) d'une nouvelle structure épithéliale de type transporteur uniquement au niveau de BP.

Remarquons que les variations les plus nettes de l'activité enzymatique spécifique se produisent dans la fraction "10.000 X g", riche en mitochondries et en fragments membranaires. Cela suggère que l'activité enzymatique liée à la régulation hyperosmotique de l'hémolymphe chez *Eriocheir sinensis* pourrait être essentiellement réduite à cette fraction dans les branchies postérieures. L'activité Na⁺K⁺ATPase de la fraction 100.000 X g ne serait pas associée de façon décisive aux mouvements ioniques transépithéliaux mais plutôt au contrôle des mouvements cellulaires de Na⁺ et de Cl⁻.

En 1988, Péqueux et Gilles examinent les différences de potentiel transépithéliales de branchies isolées et perfusées du crabe *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce. Ils proposent un modèle où les mouvements d'ions Na⁺, K⁺ et Cl⁻ (fig. 14 et 15) expliquent les différences de potentiel observées.



On notera que les 2 côtés de l'épithélium baignent dans un milieu salin identique. Dans la fig. 15, l'astérisque signifie que l'entrée par diffusion des ions Na⁺ et Cl⁻ du côté séreux de l'épithélium ne prend pas une part significative dans l'établissement de la différence de potentiel. Le double astérisque indique que la sortie de Cl⁻ est dirigée par le potentiel de diffusion de K⁺.

1.2.3. Conclusions

Les branchies du crabe *Eriocheir sinensis* sont un modèle intéressant pour l'étude des mouvements d'ions transépithéliaux dans le cadre du contrôle de l'osmorégulation chez les Crustacés. On constate que :

- les branchies peuvent présenter deux types d'épithélium : un épithélium mince, respiratoire et non transporteur, et un épithélium épais pouvant transporter des ions.
 Chez *Eriocheir sinensis*, l'épithélium transporteur se retrouve uniquement dans les 3 paires de BP, les 3 paires de BA possédant uniquement un épithélium de type respiratoire;
- la perméabilité au sodium des branchies antérieures est relativement élevée et peut être modulée, via un mode "à long terme", suivant que l'animal doit survivre en eau de mer ou en eau douce, mais aussi via un mode "intermédiaire" par le niveau de sodium dans le milieu extérieur. La perméabilité au Na⁺ dans les BP est très faible;

- la prise active de sels par les branchies postérieures implique des processus de transport indépendant pour Na⁺ et Cl⁻. Ces mécanismes demandent au minimum un système d'échange Na⁺/H⁺ et Cl⁻/HCO₃⁻ localisé du côté apical de l'épithélium transporteur;
- l'activité du transport du Na⁺ peut être activée ou inhibée par la concentration en Na⁺ de l'hémolymphe : à faible concentration de Na⁺ hémolymphatique (crabe d'eau douce), l'activité transportrice est élevée. A de plus hautes concentrations de Na⁺ hémolymphatique (crabe acclimaté à l'eau de mer), l'activité transportice est faible;
- il semble que la capacité de transport actif est absente chez les animaux acclimatés à l'eau de mer et s'élabore progressivement lors de leur acclimatation à l'eau douce. Cette mise en place progressive d'activité peut être mise en relation avec un développement progressif du système de replis apicaux de l'épithélium transporteur et basolatéral;
- le modèle de l'organisation structurale et fonctionnelle de la branchie, décrite pour le crabe chinois, peut être appliqué aux autres crabes euryhalins. L'importance du système transporteur dans les BP d'*Eriocheir sinensis* rend cependant l'espèce quasiment unique pour étudier non seulement les processus de transport d'ions mais aussi la relation structure - fonction dans un épithélium transporteur.

1.3. L'ion calcium et le transport calcique

1.3.1. Introduction

Les Décapodes marins perdent leur Ca⁺⁺ corporel au cours de l'exuviation, et la calcification du nouvel exosquelette est achevée presque entièrement avec le calcium absorbé à partir de l'eau de mer (Robertson, 1960; Graf, 1978). Alors que la concentration en calcium disponible à partir de cette source est constante pour les sténohalins; les Décapodes euryhalins, comme le crabe chinois *Eriocheir sinensis*, vivent dans des milieux où la salinité fluctue, et peuvent avoir à se recalcifier avec un milieu en teneur calcique similaire au taux de calcium en eau douce. C'est d'autant plus important que la croissance du crabe *Eriocheir sinensis* se réalise en eau douce. Les Crustacés d'eau douce ont la particularité de présenter des mécanismes du transport du calcium avec une haute affinité pour les ions calcium, qui saturent dans la concentration faible en calcium dans laquelle ils vivent.

1.3.2. Importance de l'ion calcium

1.3.2.1. Le signal calcium

La fixation des Ca⁺⁺ par les calciprotéines joue un rôle fondamental dans la création du signal calcium intracellulaire. Des protéines situées dans la membrane plasmique du reticulum endoplasmique et des mitochondries régulent la concentration en (Ca⁺⁺) libre dans le cytoplasme. En fixant l'ion et en le transportant vers l'intérieur ou l'extérieur du cytosol, ces protéines sont à l'origine des variations de concentration qui constituent le signal calcium. Ces protéines expliquent aussi la très faible concentration en calcium libre dans la cellule par rapport à la concentration du milieu hémolymphatique. Cette faible concentration en Ca²⁺ intracellulaire est indispensable pour deux raisons :

- pour éviter la formation de cristaux d'hydroxyapatite (combinaison Ca⁺⁺ phosphate)
 qui provoquerait la mort cellulaire.
- pour utiliser cet ion comme messager intracellulaire sans utiliser trop d'énergie (ATP).

On notera aussi que le transport des ions Ca⁺⁺ est différent selon le type de membrane qui l'effectue : par exemple, on retrouve dans les membranes mitochondriales et dans les membranes plasmiques un échangeur sodium - calcium, inexistant dans la membrane du reticulum sarcoplasmique (voir 1.3.2.3.).

La pompe à Ca⁺⁺, par contre, est absente dans la membrane mitochondriale mais présente dans les deux autres types de membrane. Enfin, signalons que chaque membrane possède ses caractéristiques propres quant au transport des divers ions divalents.

Deux types de protéines assurent l'évacuation des Ca++ :
- certaines ne fixent et ne transportent les ions que lorsque la concentration en Ca⁺⁺ intracellulaire est élevée, mais elles peuvent transporter beaucoup d'ions. Ces transporteurs sont dits de "faible affinité" et servent à évacuer les Ca⁺⁺ des cellules endommagées ou stimulées;
- d'autres transporteurs fixent les Ca⁺⁺ lorsque ceux-ci sont en très faible concentration mais leur capacité de transport est faible : ces transporteurs de forte affinité ajustent précisément la concentration en ions calcium dans les cellules non stimulées.

1.3.2.2. Le calcium en tant que médiateur

Le calcium est ce que l'on appelle un messager secondaire : on peut se demander pourquoi un ion minéral joue ce rôle, et pourquoi l'ion calcium plutôt qu'un autre ion divalent. En fait, le calcium a l'avantage d'être un ion ubiquiste et abondant dans tous les sytèmes biologiques. De plus, si on étudie ses propriétés physicochimiques, on s'aperçoit que son rayon ionique (0,99 Å) est tout à fait indiqué pour permettre à cet ion de se placer dans le domaine protéique capable de lier le Ca⁺⁺. Mais alors, pourquoi pas le Mg⁺⁺ ? Considérons la réactivité chimique de ces 2 ions : lorsqu'ils forment un complexe avec une protéine, ils se lient fortement à 6 atomes donneurs d'e⁻ (oxygène), formant ainsi un motif octaèdrique. L'ion calcium est plus gros que l'ion Mg⁺⁺, et peut se lier avec 7 ou 8 atomes d'oxygène (d'où liaison plus forte). Comme Mg⁺⁺ est plus petit, il attire plus fortement les atomes d'oxygène, la protéine maintenant sa forme primitive.

Ainsi, les Mg⁺⁺ n'établissent pas 6 liaisons avec la protéine mais se lient aussi à des molécules d'eau, d'où une liaison Mg⁺⁺- protéine moins forte. On remarquera également que la liaison Ca⁺⁺- protéine est plus spécifique que la liaison Mg⁺⁺protéine.

En conclusion, l'intensité et la spécificité de la liaison sont les qualités essentielles du messager intracellulaire : les ions calcium les possèdent au plus haut point. Les ions Ca⁺⁺ ont la particularité de se fixer sur de nombreuses protéines

présentant éventuellement une activité enzymatique. Le tableau suivant reprend les principales protéines se liant aux Ca⁺⁺ :

enzyme ou protéine structurale	tissu où l'enzyme a été caractérisé	voie métabolique		
phosphodiesterase agissant sur les nucléotides cycliques	muscle	active l'hydrolyse de l'AMP-cyclique et du GMP-cyclique		
adénylate-cyclase	muscle cerveau	accroît la synthèse de l'AMP-cyclique		
kinase agissant sur la chaîne légère de myosine	muscle	phosphorylation de la myosine (contraction musculaire)		
phosphorylase-kinase	muscle	active les phosphorylases responsables du catabolisme du glycogène		
kinase phosphorylant plusieurs protéines	muscle cerveau médullo-surrénale	phosphoryle glycogène-synthase, tyrosine- hydroxylase, tryptophanne-hydroxylase		
phospholambane-kinase	muscle cardiaque	phosphoryle le phospholambane, protéine musculaire, d'où activation du pompage de Ca ⁺⁺ dans le réticulum sarcoplasmique		
protéine-phosphatase dépendant de la calmoduline	muscle cerveau	déphosphoryle diverses protéines activées par phosphorylation, en particulier des kinases.		
sytocalbines (calspectine)	cytosquelette, toutes cellules	régulent le fonctionnement des protéines du cytosquelette		

On constate, par exemple, que la plupart des kinases de protéine, une fois activées par le Ca⁺⁺ (qui a formé un complexe actif avec la CaM), peuvent être phosphorylées; cette phosphorylation altère les propriétés des protéines cibles; il en résulte une variation de fonction de la cellule due à l'action antérieure du second messager calcium.

Les ions calcium sont capables d'accélérer la respiration : les Ca⁺⁺ stimulent un enzyme, lequel active la pyruvate déshydrogénase (PDH) et inhibe un enzyme qui inactive la PDH; l'augmentation de la quantité de PDH active stimule la transformation du pyruvate en acétyl coenzyme A. Une augmentation de l'acétyl coenzyme A "accélère" le cycle de Krebs, comme le font les ions Ca⁺⁺ en stimulant deux enzymes catalysant des étapes du cycle (α -CGDH et IDH) (voir fig. 16). Une quantité supérieure de NADH entre dans la chaine respiratoire de la membrane interne de la mitochondrie où une oxydation fournira l'énergie pour la synthèse d'ATP.



L'inositol-triphosphate paraît être le second messager entre certains récepteurs d'hormones ou de protéines de croissance et les réserves intracellulaires en ions Ca⁺⁺ situés dans la membrane plasmique et dans les vésicules du réticulum endoplasmique. Ces vésicules sont la cible de l'inositol-triphosphate (IP₃).

Le processus de libération de Ca⁺⁺ comporte un stade d'amplification : il y a 20 Ca⁺⁺ libérés pour 1 IP₃ se fixant sur la membrane des vésicules. Un autre lieu de mise en réserve de Ca⁺⁺ est constitué par les vésicules du réticulum endoplasmique lisse. Ces vésicules sont situées à distance de l'extérieur de la cellule : il faut un moyen de transmission entre les stimuli extracellulaires et les vésicules. Dans certains cas, c'est l'inositol-triphosphate qui se fixe sur des récepteurs spécifiques de ces membranes et

en fait sortir le calcium. Le taux de Ca⁺⁺ des vésicules est très élevé par rapport à celui du cytoplasme. Une protéine phosphorylée de 11.300 daltons paraît le fixer dans le foie et une autre dans le muscle, est appelée calséquestérine. Ces phénomènes de mise en réserve du Ca⁺⁺ dans les vésicules sont largement présents dans les cellules musculaires où l'organite équivalent est appelé reticulum sarcoplasmique. Un troisième lieu de mise en réserve de Ca⁺⁺ est constitué par les mitochondries. Sa mise en oeuvre comme réserve de Ca⁺⁺ servant de second messager est plus controversée.

1.3.2.3. Les pompes à Ca++

La membrane plasmique contient des protéines permettant l'évacuation des ions calcium de la cellule (voir figure 17). Un système à haute affinité, nommé ATPase, scinde l'ATP et en récupère l'énergie, ce qui lui permet d'évacuer les ions calcium malgré la différence de concentration entre les 2 faces de la membrane plasmique $(10^{-3} \text{ M} / 10^{-7} \text{ M})$.

Fig. 17.

	CANAL CALCIUM	SODIUM-CALCIUM	DU CALCIUM
+	1. 1. 1. 1. 1.		1 1
		1Ca2+ MEMBRA	H• Ca*•
CY	TOSOL		ATP ADP + P

Le système de transport tient en une seule molécule : une partie de la protéine clive l'ATP et une autre partie fixe et transporte les ions Ca⁺⁺. Cette pompe, découverte par H. Schatzmann (1966) se retrouve dans la plupart des tissus de mammifères. Son mécanisme d'action est le suivant : quand les ions Ca⁺⁺ intracellulaires se lient à la CaM, cette dernière active la pompe en s'y fixant. Une fois activée, la pompe à calcium réduit la concentration en calcium intracellulaire. Quand la (Ca⁺⁺ + Mg⁺⁺)ATPase évacue les Ca⁺⁺ de la cellule, elle fait entrer dans un même temps des protons, à raison de 2 protons pour un Ca⁺⁺ afin de maintenir l'équilibre électrique. Il n'existe pas moins de 4 systèmes de régulation de cette pompe : en effet, outre l'activation par la CaM, elle est également activée par le phosphatidyl inositol diphosphate. Le clivage de l'ATPase (perte d'un fragment d'un PM de 50.000 pour un PM total de 135.000) par des enzymes protéolytiques est également un autre système de régulation, tout comme la phosphorylation de la pompe par une protéine kinase, elle-même activée par l'AMPc.

L'ATPase de la membrane plasmique est une pompe de forte affinité par le Ca⁺⁺ et elle répond à des augmentations infimes de la concentration intracellulaire en ions Ca⁺⁺. Des variations plus importantes de concentration sont nécessaires pour activer l'autre système d'expulsion des ions calcium : l'échange sodium - calcium. Cette protéine de transport est très abondante dans les cellules excitables (cellules nerveuses et musculaires) où la concentration en ions calcium varie fréquemment et rapidement en réponse à des excitations électriques. A la différence de l'ATPase, il ne produit pas lui-même l'énergie nécessaire au transport des Ca⁺⁺ mais utilise deux sources d'énergie : le gradient chimique des ions Na⁺ et le gradient électrique transmembranaire.

On notera que le reticulum sarcoplasmique, régulateur rapide et sensible de la concentration en Ca⁺⁺ intracellulaire, possède également une pompe à Ca⁺⁺, mais l'échangeur sodium - calcium est absent.

1.3.2.4. Les Ca++ATPases

Introduction

L'ATPase stimulée par le calcium et le magnésium, souvent notée $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPase$, s'identifie à la pompe à calcium. Les caractéristiques des membranes contenant les $(Ca^{2+}+Mg^{2+})ATPases$ ont été largement décrites par Schatzmann en 1975, Vincenzi et Hinds en 1976 et Roufogalis en 1979.

Depuis 1970, de nombreux travaux se sont intéressés à la localisation, la physiologie et la régulation des Ca²⁺ATPases; ainsi. Ma et al. en 1974, rapportent l'existence d'une Ca²⁺ATPase dans les membranes plasmiques isolées à partir de branchies de truite ar-en-ciel Salmo garidneri . Fenwick (1976) décrit aussi un système enzymatique similaire à celui de l'anguille d'Amérique du Nord Anguilla rostrata adaptée à l'eau douce. Ils suggèrent que les ATPases dépendant du calcium, identifiées dans les branchies de certaines espèces euryhalines, pourraient réguler les échanges calciques transépithéliaux. En 1980, Ho et Chan démontrent l'existence d'ATPases branchiales activées par le Ca++ et d'un transport ionique chez l'anguille japonaise Anguilla japonica ; ils signalent que l'enzyme est activé par le calcium ou le Mg⁺⁺, à une concentration en ion divalent de 3mM, à une température comprise entre 25 et 35°C, et entre pH 8,1 et 8,3. Le calcium montre une plus grande affinité pour l'enzyme que le Mg⁺⁺. En 1981, Doneen a mesuré les activités enzymatiques branchiales d'un poisson téléostéen, Gillichthys mirabilis. L'activité Ca²⁺ATPase peut se séparer en 2 types d'activités : un enzyme à haute affinité pour le calcium (Km 2,9 μM) et un enzyme à faible affinité pour le calcium (Km 0,88 mM). Ces activités varient très fort suivant la salinité du milieu environnant.

En 1982, Ghijsen et al. mettent en évidence une étroite corrélation entre le Vmax de la Ca²⁺ATPase et le Vmax mesuré pour le transport calcique dépendant de l'ATP. Ils émettent, à partir de ces résultats, l'hypothèse que ces 2 systèmes sont l'expression de la pompe à calcium localisée dans les membranes plasmiques basolatérales du duodénum de rat.

En 1984, Ansah et al. montrent qu'il existe une activité $Ca^{2+}ATPasique dans$ les membranes plasmiques des cellules acineuses pancréatiques de rat et que la calmoduline (CaM) augmente la sensibilité au calcium de ce système enzymatique, en présence de Mg²⁺. La CaM se lie de façon Ca⁺⁺ dépendante à des protéines de 130.000 et 230.000 daltons, protéines présentes dans des fractions enrichies en membranes plasmiques. La même année, Flik et al. (1984) démontrent l'existence de 2 types de Ca²⁺ATPase à affinité différente pour le calcium; la Ca⁺⁺ATPase à haute affinité se révèle être dépendante de la CaM, et montre toutes les caractéristiques d'une pompe à calcium. Cet enzyme à haute affinité pour le calcium, préférant le Mg⁺⁺ATP comme substrat et stimulable par la CaM, possède les 3 caractéristiques qui identifient ce système au transport Ca²⁺ATPasique érythrocytaire des mammifères (Vincenzi et Larsen, 1980).

Cette année, Evers et al. (1988) ont recherché une pompe au Ca⁺⁺ dépendant de l'ATP dans les membranes plasmiques basolatérales de foie de rat. Un intermédiaire phosphorylé, dépendant du calcium et de poids moléculaire de \pm 135.000 est mis en évidence, et cette protéine se révèle être une Ca²⁺ATPase; c'est bien l'expression enzymatique de la pompe à calcium qui a été mesurée.

Les Ca²⁺ATPases et les phosphatases alcalines

En 1980, Ghijsen et ses collègues ont voulu dissocier les activités $Ca^{2+}ATPase$ et les phosphatases alcalines, en utilisant la possibilité d'inhiber spécifiquement ces enzymes. Leurs travaux sur les membranes plasmiques de duodenum de rat montrent que la faible activité phosphatasique est une phosphatase "alcaline-like" et que la phosphatase à haute affinité est la $Ca^{2+}ATPase$ avec les caractéristiques de transporteur d'ions. Ils mettent également en évidence une phosphatase localisée exclusivement dans les membranes basolatérales et qui possède une haute affinité pour le Ca^{2+} , sans être inhibée par les inhibiteurs des phosphatases alcalines, et qui est inhibée spécifiquement par un antagoniste de la calmoduline, la chlorpromazine. La phosphatase de faible affinité est localisée aussi bien dans les bordures en brosse que dans les membranes basolatérales, possède un site de faible affinité pour le calcium et se trouve inhibée par la théophylline, inhibiteur spécifique des

phosphatases alcalines.

En 1983, Flik et al. étudient les phosphatases dépendantes du calcium et mesurent les activités phosphatasiques dans les membranes plasmiques de branchies d'anguilles *Anguilla rostrata* ; ils montrent que l'hydrolyse de l'ATP activée par le calcium résulte d'un pool hétérogène de phosphatases. Ils montreront également que la chélation du Ca²⁺ ou du Mg²⁺ est une condition prérequise pour que les esters d'adénosine phosphate servent de substrat aux phosphates des membranes plasmiques de branchies.

Ces quelques données montrent que l'utilisation de molécules telles que les acides aminés ou phénothiazines permet de mettre en évidence les différents "types d'ATPases" dans un tissu présentant une activité phosphatasique.

1.3.3. L'ion calcium et la calmoduline

1.3.1.1. Liaison du Ca²⁺ à la CaM

L'interaction Ca²⁺-CaM avec les enzymes s'effectue au minimum en 2 étapes : a) CaM_{inact} + n Ca²⁺ \longrightarrow CaMCa_n²⁺ \longrightarrow (CaM*Ca_n²⁺)_{act}

L'astérisque marque un changement de conformation, cette étape représente la liaison de la CaM au calcium. On observe une augmentation de 5 à 10 % de l'hélice α dans la structure de la calmoduline.

 b) La forme active de la CaM interagit avec l'enzyme inactif (la (Ca⁺⁺ + Mg⁺⁺)ATPase, par exemple) ou partiellement actif :

 $CaM^*Ca_n^{2+} + enz \Longrightarrow (CaM^*Ca_n^{2+}) enz \Longrightarrow (CaM^*Ca_n^{2+}) enz^*$

"n" peut varier de 1 à 4 et l'analyse cinétique montre que la CaM assure sa forme active avec 3 ou 4 Ca^{2+} liés. L'augmentation de la CaM pour le Ca⁺⁺ est très forte une fois les 2 premiers Ca^{2+} fixés (coopérativité).

Les réactions sont réversibles et leur sens est déterminé par la concentration en calcium intracellulaire $(10^{-6} à 10^{-7} M dans le cytoplasme)$. Quand cette concentration augmente, la réaction est totalement déplacée vers la droite. Le calcium "excédentaire" ira vers le réticulum endoplasmique ou vers les pompes à Ca⁺⁺ (ou les mitochondries). Quand la concentration en Ca⁺⁺ intracellulaire redevient "normale", le complexe se dissocie : cette étape correspond à la fin du signal calcium.

1.3.1.2. Modèle d'un transport actif de calcium à travers un épithélium branchial : rôle de la CaM

C'est Flik qui, en 1985, met en évidence une Ca²⁺ATPase de haute affinité et un transport calcique dépendant de l'ATP dans des préparations membranaires du Cichlidé *Oreochromis mossambicus*. Il présente alors le modèle ci-dessous (fig. 18) pour expliquer le transport actif transépithélial du calcium dans les branchies postérieures transportrices.

Fig. 18.



Ce graphe exprime la variation de la concentration en calcium lors de son passage à travers la cellule à chlorure (voir ligne en pointillé : schéma ci-dessus).

Le transport calcique peut être stimulé par des concentrations en calcium intracellulaires. Comme la concentration en Ca⁺⁺ en eau douce est généralement 100 X plus élevée que dans le milieu intracellulaire, le Ca⁺⁺ extérieur peut entrer passivement dans les cellules à chlorure, contre un gradient électrochimique. Le Ca⁺⁺ est tamponné dans le cytosol par une protéine liant le calcium. L'activité Ca⁺⁺ATPase de haute affinité intervient dans la sortie du Ca⁺⁺ vers le fluide extracellulaire; cette ATPase, activable par la calmoduline, produit l'énergie nécessaire pour transporter le calcium contre un gradient de concentration. Comme le montre la figure 18, la sortie du calcium s'effectue à travers les membranes du système tubulaire qui établit une continuité entre les membranes basolatérales de l'espace intracellulaire et l'hémolymphe.

Chapitre II : Orientation du travail

La calmoduline, capable de fixer les ions Ca^{2+} , peut former un complexe actif avec celui-ci; ce complexe joue un rôle très important dans la régulation de nombreux processus cellulaires où le calcium intervient. Une des protéines-cible, la Ca^{2+} -ATPase ou pompe à calcium, est dépendante de la calmoduline; elle assurerait le transport des ions Ca^{2+} à travers l'épithélium branchial. Le but de notre travail est d'étudier le rôle régulateur de la CaM sur les pompes à Ca^{2+} présentes dans les branchies de Crustacés euryhalins adaptés à l'eau douce. Le choix de la branchie est lié au fait que cet organe, chez le crabe osmorégulateur *Eriocheir sinensis*, représente un bon modèle pour expliquer les mouvements ioniques transépithéliaux (Péqueux et Gilles, 1988).

Nous tenterons dans un premier temps de prouver l'existence d'un activateur protéique de la PDE_{AMPc} (CaM) dans les branchies antérieures et postérieures du crabe *E. sinensis* adapté à l'eau douce. Nous effectuerons un fractionnement en vue d'isoler un activateur thermostable non dialysable capable d'activer la PDE_{AMPc} . On recherchera ensuite la présence d'une activité phosphatasique dans un homogénat de BA et de BP, pouvant s'identifier à la Ca²⁺-ATPase à haute affinité (pompe à calcium).

Nous essaierons de mesurer l'effet des ions divalents comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+} , puisque la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPase est active en présence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} . Ensuite, nous tenterons, en utilisant des antagonistes de la calmoduline, de détecter la présence de pompes à calcium dans un homogénat (H) de BA et BP du crabe *E. sinensis*. A cette fin, les 4 inhibiteurs suivants seront employés : théophylline, cystéine, trifluopérazine et calmidazolium. Enfin, nous réaliserons le dosage de la PDE_{AMPc} (un enzyme qui peut être dépendant de la calmoduline), afin de montrer que la CaM ne joue pas un rôle physiologique unique au sein d'un homogénat (H) de BA et de BP de crabe *E. sinensis*, mais qu'elle peut réguler d'autres protéines-cible que la pompe à calcium supposée présente chez les Crustacés.

Chapitre III : Matériel et méthodes

3.1. Introduction

3.1.1. Présentation de l'animal

Le matériel expérimental utilisé est le crabe chinois *Eriocheir sinensis*. C'est un Crustacé Décapode Brachyoure. Le genre *Eriocheir* compte 3 espèces : une japonaise et deux chinoises. Ce type de crabe a été introduit par hasard sur la côte allemande vers 1912, d'où il a progressivement gagné la mer Baltique et les côtes de Hollande, de Belgique, de France et même d'Angleterre. Les crabes utilisés ont été capturés dans des lacs d'eau douce près d'Emden (Nord de l'Allemagne Fédérale); ils seront uniquement de sexe mâle : ces derniers possèdent des touffes de poils sur les chélipèdes, comme le montre la figure ci-dessous.



La croissance de cet hyperrégulateur euryhalin s'effectue en eau douce mais le crabe chinois migre vers la mer pour la reproduction. Sa couleur prédominante est vert-gris. Les crabes sont placés dans une eau de ville à $16 \pm 2^{\circ}$ C continuellement oxygénée; ils sont nourris deux à trois fois par semaine avec des granulés pour truites, et ne sont pas éclairés artificiellement.

La branchie constitue, chez les poissons et les crabes "d'eau douce", l'organe osmorégulateur principal. La figure 19 décrit, à titre d'exemple, l'organisation structurale de la branchie du crabe euryhalin *Callinectes sapidus*.

Fig. 19.



La structure branchiale apparaît comme une succession de lamelles branchiales (la), chacune de ces lamelles comprenant la cuticule (cu), des cellules épithéliales (ec) et pillaires (pc), plus un espace hémolymphatique (bs).

3.1.2. Fractionnement subcellulaire de branchies de crabe Eriocheir sinensis

Après avoir ôté la carapace d'un crabe, on prélève rapidement les branchies antérieures et postérieures (BA et BP) qui seront traitées séparément pendant le fractionnement. Les branchies sont séchées sur un papier filtre, pesées, et découpées en petits morceaux. Ceux-ci sont placés dans un homogénéiseur type Kontès Dual Size 23 (à froid), contenant un tampon A (Tris-HCI 20mM, EGTA 1mM pH 8). La dilution finale est de X 10. On homogénéise alors 2 x 30 secondes à grande vitesse (foreuse). L'homogénat obtenu est alors rincé avec 1 ml de tampon A. Une partie de cet homogénat est placé dans des tubes pour rotor Beckman type 40.3, lui-même déposé dans une centrifugeuse Beckman type L2-75B. Une centrifugation pendant 60 minutes à 100.000 X g donne un culot C1 et un surnageant S1. C1 est mis en suspension dans 2 ml de tampon A à 4°C. Une partie de S1 est reprise dans 2 tubes Dupont cat. N0. 00152 qui seront placésdans un bain bouillant à 100°C (Kottermann) pendant 4 min 30" : ce bain dénature la phosphodiestérase endogène et les protéines non thermostables liant la calmoduline; on évite ainsi une sous-estimation de la quantité de calmoduline lors de la mise en évidence de la CaM.

Les surnageants des branchies antérieures (S1A) et postérieures (S1P) sont ensuite centrifugés à 20200 X g pendant 30 minutes (Rotor type SS34 placé dans une centrifugeuse Sorvall type RC5). Cette seconde centrifugation élimine les protéines dénaturées du surnageant. On obtient un second culot (C2) et un second surnageant (S2). Une partie de S2 est dialysée contre du Tris-HCI 20mM pH8 sans EGTA (tampon B) pendant 24 heures.

<u>Rem</u>. L'EGTA dans le tampon A chélate le calcium, ce qui extrait la calmoduline de la fraction particulaire afin d'en récupérer le maximum dans S1. Le surnageant dialysé est appelé S3.

La figure 20 ci-dessous résume les étapes du fractionnement.



3.2. Les différents dosages

3.2.1. Dosage de protéines

3.2.1.1. Principe

La méthode utilisée pour doser les protéines dérive de celle décrite par Lowry (1951) : après une hydrolyse alcaline en présence de cuivre, les groupements réducteurs des protéines (tyrosine et tryptophane) sont mis en présence du réactif de Folin.

3.2.1.2. Solutions

- NaOH 2N (Merck art. 6498)
- HCI 1N (Merck art. 317)
- solution cuivrique tartrate de Na-K 0,1 % (Merck art. 8087)

CuSO ₄	0,05 % (Merck art. 2791)				
NaOH	0,5 N (Merck art. 6498)				
Na ₂ CO ₃	10 % (Merck art. 6492)				

- réactif de Folin : solution de Folin (UCB) diluée 17 fois

 solution étalon : solution de serum albumine bovine (SAB) (Merck art. 12018) de 2,8 mg/ml dans le tampon A (Tris-HCl 20mM, EGTA 1mM pH 8).

3.2.1.3. Mode opératoire

Dans chaque tube "test" contenant 1 ml de NaOH 2N, on ajoute un volume connu d'échantillon (fraction H, C1 ou S1) et du tampon A, de façon à obtenir un volume final de 2 ml. Les tubes sont portés à ébullition pendant 30 minutes puis, après refroidissement, neutralisés par addition de 2 ml d'HCl 1N par tube.

On ajoute 1 ml de solution cuivrique. Après 10 minutes, on ajoute le réactif de Folin dans chaque tube toutes les 30 secondes. Les tubes sont alors placés dans un incubateur (type Juvabo V.C) à 55°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, on lit toutes les 30 secondes l'absorbance de la solution à 650 nm, au spectrophotomètre (Pye Unicam SP6-550UV-VIS). Pour chaque dosage, on réalise une courbe d'étalonnage afin de définir la zone de linéarité de ce dosage. Dans notre cas, la linéarité entre la variation d'absorbance et la concentration en protéines se vérifie jusqu'à 70 γ / test.

3.2.2. Mise en évidence de la calmoduline

3.2.2.1. Principe

Le principe du dosage enzymatique de la calmoduline via la PDE_{AMPc} est illustré à la figure 21 : c'est un dosage indirect, qui utilise la capacité que possède la CaM à stimuler la PDE dépendante de la CaM, enzyme hydrolysant l'AMPcyclique.

fig. 21.



La réaction s'effectue en deux étapes : la première étape représente l'hydrolyse de l'AMPc par la PDE, qui produit le 5'-AMP. L'étape suivante est la transformation du 5'-AMP en adénosine + Pi par la 5'-nucléotidase, présente dans une solution purifiée à partir de venin de serpent (V.S) qui ne contient pas d'activité PDE.

Une résine échangeuse d'anions sépare l'adénosine du Pi; le Pi étant chargé négativement, il est gardé par la résine, au contraire de l'adénosine marquée. Cette adénosine radioactive se retrouve dans le surnageant obtenu après centrifugation. On ajoutera le liquide à scintillation à ce surnageant.

Les deux étapes de la réaction ne peuvent pas être combinées : la PDE est stimulée irréversiblement par les enzymes protéolytiques contenus dans le venin de serpent; la PDE ne réagit plus avec la calmoduline.

3.2.2.2. Solutions

- tampon D : sucrose (sucre blanc de Tirlemont) 0,25 M, imidazole HCI 50 mM (Merck art. 4716) pH 7,4.
- phosphodiestérase : (PDE) l'enzyme dépourvu d'activateur protéique (10 U. Sigma P-9529) est mis en solution dans 1 ml d'une solution aqueuse de glycérol 50 % (UCB 1384). Cette solution enzymatique, dont l'activité catalytique reste stable, est diluée avant chaque essai avec 1 ml d'une solution de saccharose 0,25 M imidazole - HCI 50 mM pH 7,4 (tampon C). L'activité enzymatique spécifique est de 0,2 U/ml. <u>Rem</u>. Plusieurs essais montrent que la mise en solution de la
 - PDE avec du glycérol est nécessaire pour le maintien de l'activité catalytique.
- AMPc : solution 0,4 mM (Boeringher 102296) dans du Tris-HCl 40 mM (Janssen 16.762.78) et MgCl₂.6H₂O 20 mM (Merck art. 5833) pH 8
- AMPc* : solution H³ AMPc (Amersham TRK 304) de 26,1 Ci-mmole : 25 μCi sont placés dans 5 ml d'un tampon Tris-HCl 40 mM + MgCl₂ 20 mM pH 8.

- résine échangeuse d'anions (Dowex 2 X 8, Fluka art. 44385) : après avoir placé 30 g

de résine sèche sur un papier filtre Schleicher et Schuell (Ø 125 mm, réf. n° 312611), monté sur un vase dit "de Buchner", on actionne la pompe à eau et on fait passer une solution de NaOH 0,5 M (volume correspondant au volume de résine sèche). On lave à l'eau distillée 4 à 5 fois. La résine est alors placée dans un bécher où on ajoute du HCI 0,5 N pendant 30 minutes. La résine est alors filtrée sur un papier filtre neuf, puis rincée jusqu'au moment où le pH est supérieur à 4; la résine est finalement placée en suspension dans un mélange de 50 ml d'eau distillée et de 50 ml d'éthanol absolu (30 g résine / 100 ml).

- CaM : solution aqueuse (Sigma P-2277) de 1,88 γ /ml.
- solution "test" : solution S3 (voir fractionnement) à raison de 5 à 30 λ / test.
 Un étalon interne peut être ajouté.

- solution "5'-nucléotidase" : solution aqueuse (Sigma V-O376) d'1 mg/ml.

3.2.2.3. Mode opératoire

Dans un tube Falcon (type 2053) sont déposés les solutions suivantes (volumes en ml) :

PDE	Tampon D	AMPc	CaM	H2Obid	AMPc*
0,050	0,050	0,025	x	0,050 -X	0,025

Après une incubation à 30°C pendant 30 minutes, les tubes sont placés au bain-marie à 100°C pendant 90 secondes. Après refroidissement, on ajoute 50 λ de solution contenant la 5'-nucléotidase. Une incubation pendant 10 minutes à 30°C suivie d'un passage au bain-marie termine la réaction d'hydrolyse du 5'-AMP. On

ajoute alors 1 ml de la suspension de résine; le mélange est ensuite agité pendant 45 secondes (Vortex cat. n° 1291) puis laissé pendant 2 heures à 4°C. Après une seconde agitation (30" au Vortex), les tubes sont placés dans une centrifugeuse Sorvall type RC 5 qui tourne pendant 15 minutes à 20200 X g. On prélève 0,4 ml du surnageant auquel on ajoute 4 ml de liquide scintillant (Aqualuma). Les fioles sont alors déposées dans un compteur à scintillation (Beckmann type LS-3150T).

- <u>Rem.</u> Pour chaque dosage, on réalise un "tube contrôle" où la solution enzymatique de PDE est dénaturée à 100°C pendant 7 minutes. Ces tubes "contrôles" suivent le même mode opératoire que les tubes tests.
 - La quantité d'AMPc hydrolysée est calculée en plaçant 15 λ de solution "AMPc*" dans 4 ml de scintillant.
 - On effectue un contrôle du pouvoir échangeur de la résine en plaçant 1 ml de cette résine en présence de 15 λ d'AMPc*.

3.2.3. Mesure de l'hydrolyse de l'ATP

3.2.3.1. Principe

On mesure la quantité de phosphate inorganique produit après hydrolyse enzymatique d'une solution d'ATP.

3.2.3.2. Solutions

- Solution 1 : Tris-HCI 50 mM, NaCI 200 mM (Merck art. 6404) à pH 7,4
- Solution 2 : solution aqueuse de CaCl₂.2H₂O 50 mM (Merck art. 2382)

Solution 3 : solution aqueuse d'ATP 50 mM (Sigma A-3377) neutralisée à pH 7,0 avec du Tris

Tampon B : Tris-HCI 20 mM pH 8

Réactif de Fiske Subbarow : addition successive de :

H₂O (3,3 ml)
solution aqueuse de molybdate d'NH₄+ 2,5 % (Merck art. 806356) dans H₂SO₄ 5 N
solution aqueuse de NaHSO₃ 15 % et de Na₂SO₃
20 % (Merck art. 6657)

20 % (Merck art. 6657).

Etalon PO₄³⁻ : solution aqueuse de NaH₂PO₄ 1 mM (Merck art. 6346) Théophylline : solution 10 mM de théophylline (Fluka art. 88310) dans le tampon B Cystéine : solution 40 mM de cystéine (Sigma C-7780) dans le tampon B Trifluopérazine : solution 1 mM de trifluopérazine (Sigma T-8516) dans le tampon B

Calmidazolium : solution 0,01 mM de calmidazolium (Sigma C-1278) dans l'éthanol. On notera que ce composé est très lipophile et requiert l'utilisation de tubes plastiques. On fera une incubation à 37°C pendant 15 minutes avant d'y ajouter l'ATP.

3.2.3.3. Mode opératoire

On place dans chaque tube 1 ml de Solution 1; 0,2 ml de Solution 2; 0,2 ml de Solution 3, la solution enzymatique (H ou C1) et le tampon B (Tris-HCl 20 mM pH 8) de façon à obtenir un volume final d'incubation égal à 2 ml.

On incube à 37°C pendant une heure. On ajoute 1 ml de TCA 30 % dans chaque tube. Après centrifugation (IEC Centra - 4B centrifuge) pendant 15 minutes à 2000 RPM, on dosera le phosphate sur 1 ml d'aliquot, en ajoutant 4 ml de réactif de Fiske Subbarow toutes les 20 secondes.

Après 20 minutes, les absorbances sont lues, toutes les 20 secondes, au spectrophotomètre (Pye Unicam SP6-550UV-VIS) à 660 nm.

3.2.4. Dosage de la PDEAMPc

3.2.4.1. Rappel du principe (voir 3.2.2.1.)

Le dosage de la PDEAMPc comporte 2 étapes :

H3- AMPc PDE + H3-5'-AMP

H3-5'-AMP 5'nucléotidase > (H3) adénosine +Pi

L'hydrolyse de l'AMPc par la PDE est suivie de la transformation du 5'-AMP en adénosine radioactive et phosphate inorganique.

3.2.4.2. Solutions

- Tampon saccharose 0,25 M, imidazole-HCI 50mM EGTA 1mM, CaCl₂.2H₂O 20 mM pH 7,4
- AMPc : solution 0,4 mM (Bohringher 102.296) dans du Tris-HCl 40 mM (Janssen 16.762.78) et MgCl₂.6H₂O 20 mM (Merck art. 5833) pH 8
- 3. AMPc*, ou (H³) AMPc : voir solution 3.2.2.2.
- 4. Solution "Test" : solution H ou C1 (voir fractionnement)
- 5. Solution aqueuse de calmoduline de 1,88 γ /ml (Sigma P-2277) : CaM.

3.2.4.3. Mode opératoire

Dans un tube Falcon sont déposées les solutions suivantes (volumes en ml) :

Solution H ou C1	Tampon (voir 1)	AMPc	CaM .	H2Obid	AMPc*
х	0,1 - X	0,025	0,020	0,030	0,025

Le mode opératoire pour le dosage de la PDE dépendante de l'AMPc est identique à celui décrit en 3.1.1.3.

Chapitre IV : Résultats

4.1. Mise en évidence de la "calmoduline" au niveau de branchies de crabe *E. sinensis*

4.1.1. Matériel biologique utilisé

Des branchies antérieures et postérieures du crabe E. sinensis adapté à l'eau douce représentent un modèle intéressant pour l'étude des mouvements d'ions transépithéliaux dans le cadre du contrôle de l'osmorégulation chez les Crustacés (voir conclusions 1.2.3.). On rappellera la différence structurale et fonctionnelle entre les deux types de branchies du crabe E. sinensis : un épithélium mince, respiratoire et non transporteur dans les branchies antérieures, et un épithélium épais capable de transporter des ions dans les branchies postérieures. Le transport actif de sodium est étroitement lié à l'activité enzymatique de la Na⁺K⁺ATPase. Dans les branchies du crabe E. sinensis, cette activité Na⁺K⁺ATPase est plus élevée dans les branchies postérieures que dans les branchies antérieures. Cette différence pourrait s'expliquer si l'on envisage une quantité plus élevée de "sites de transport" dans les replis des membranes basolatérales de l'pithélium des branchies postérieures par rapport à celle contenue dans les branchies antérieures. Certains auteurs (Flik et al., 1983, 1984, 1985) se sont intéressés à d'autres systèmes transporteurs d'ions et plus particulièrement à celui du Ca²⁺. On sait actuellement que le tansport transépithélial de Ca²⁺ peut être assuré par une Ca²⁺-ATPase membranaire; cette ATPase, à haute affinité pour le calcium, est activiée par la présence de la calmoduline. Nous avons dosé la calmoduline au niveau des branchies du crabe E. sinensis adapté à l'eau douce : les différences fonctionnelles et structurales entre les deux types de branchies sont conséquentes (les branchies postérieures présentant l'épithélium d'un organe osmorégulateur et transporteur).

4.1.2. Contenu en protéines et distribution "subcellulaire".

Nous avons réalisé un fractionnement à partir d'un homgénat de branchies antérieures et postérieures du crabe *E. sinensis*. Ce fractionnement nous permet d'isoler plusieurs fractions nommées C1, C2, S1, S2, S3. Deux fractions nous intéressent particulièrement :

 - la fraction C1 contient un ensemble de structures membranaires (supposées enrichies en Ca²⁺-ATPases)

- la fraction S3, supposée contenir un activateur thermostable de la PDE.

Le contenu en protéines dans chacune des fractions subcellulaires appelées H, C1, et S1 est présenté dans les tableaux ci-dessous :

	Crabe 1		Crabe 2		Crabe 3		Crabe 4	
	BA	BP	BA	BP	ВА	BP	ВА	BP
H (mg prot/g tissu)	59,7	84,8	96,3	109,0	65,3	74,1	71,0	106,9
C1(mg prot/g tissu)	20,4	38,2	34,2	47,8	23,8	28,2	28,0	55,8
S1 (mg prot/g tissu)	30,2	41,8	45,2	50,8	31,9	33,7	29,1	30,5
Récupération (%)	84,8	94,3	82,5	90,5	85,3	83,5	80,4	84,4

Tableau 1 :

Tableau 2 :

x							
Fraction	BA	BP	-				
н	73,1	93,7	-				
C1	26,6	42,5	-				
S1	34,1	39,2	-				
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		and the second					

 \overline{X} = moyenne (n = 4) du nombre de mg protéine / g tissu pour chaque fraction BA = branchies antérieures BP = branchies postérieures

On constate que la quantité de protéines, exprimée par g de tissu varie autour d'une moyenne de 73,1 mg dans un homogénat de branchies antérieures et est égal à 93,7 mg dans un homogénat de BP. D'autre part, la quantité de protéines dans C1 est toujours plus élevée dans les BP (42,5 mg/g) que dans les BA (26,6 mg/g). Nous pensons que ces résultats s'intègrent très bien dans le modèle morphologique présenté dans l'introduction et est typique du crabe *E. sinensis* adapté à l'eau douce.

L'épithélium des branchies postérieures contient des membranes basales et basolatérales dont les replis renferment bon nombre de protéines : la quantité de protéines est plus élevée dans le culot des BP.

L'épithélium des BA possède peu de replis membranaires, d'où une faible quantité de protéines mesurée dans le culot des BA.

On est bien en présence de crabes possédant des branchies "morphologiquement" acclimatées : des branchies postérieures "transportrices" et des branchies antérieures "respiratoires".

4.1.3. Dosage de la calmoduline

La calmoduline est une molécule contrôlant un ensemble de processus cellulaires qui tiennent compte de l'interaction de protéines et des ions calcium; Flik et al. (1984) ont montré que la calmoduline peut jouer un rôle sur les Ca²⁺-ATPases à haute affinité, isolées à partir de préparations membranaires de Cichlidés (voir 1.3.1.2.). La CaM pourrait aussi contribuer au contrôle de ce transport chez un hyperosmorégulateur adapté à l'eau douce comme*E. sinensis*.

Une partie importante de notre travail consistait à mettre au point le dosage de

la calmoduline. Plusieurs méthodes s'offraient à nous. Nous avons choisi celle qui utilise la propriété de la PDE_{AMPc} d'être activiée par la calmoduline. Nous déterminerons la quantité de CaM dans la fraction S3, stade ultime du fractionnement, (voir 3.1.2.). Rappelons que la fraction S1 a été chauffée dans le but d'éliminer au maximum les phosphodiestérases endogènes ainsi que les protéines thermolabiles.

Le dosage est basé sur la capacité que possède la calmoduline à stimuler la PDE_{AMPc}. Rappelons que la méthodologie utilisée est largement décrite dans le chapitre "Matériel et méthodes" (voir 3.2.2.). L'unité d'activité PDE représente l'hydrolyse d'une nanomole d'AMPc par 30 minutes, dans les conditions expérimentales décrites dans la légende du graphique 1.



CAM (ng).

<u>Graphique 1</u> : effet de la calmoduline sur l'activité de la PDE_{AMPc} de cerveau de boeuf. Le tampon utilisé est le sucrose 0,25 M, imidazole - HCI 50mM pH 7,4. EGTA 1mM, CaCl₂.2H₂O 20 mM, H³ - AMPc 50μM (0,125 μCi / test). L'incubation a lieu a 30 °C pendant 30 minutes.

Nous avons rencontré de nombreuses difficultés lors de la mise au point de ce dosage enzymatique :

- ce dosage est indirect car la calmoduline n'agit pas directement sur le substrat AMPc mais sur la PDE_{AMPc}, en formant au préalable un complexe actif avec le calcium; or, l'effet activateur de la "CaM" sur la PDE_{AMPc} diminue très rapidement après la mise en solution de cet enzyme (inactivation totale après 15 jours). De plus, l'activité enzymatique en absence de calmoduline diminue également au cours du temps et cette baisse entraîne la diminution de l'effet activateur de la CaM sur l'hydrolyse du substrat AMPc.

53

- Comme le montre le graphique 1, la linéarité entre l'activité PDE et la quantité de CaM n'est valable qu'entre 0 et 20 ng de CaM (étalon) par test.

En conclusion, il est très difficile de trouver un compromis entre la variation incessante du pouvoir activateur de la CaM et la baisse d'activité enzymatique en absence de calmoduline, tel qu'on obtienne une linéarité entre l'activité PDE et la quantité de calmoduline. On s'aperçoit ici de l'importance du **glycérol** dans la conservation de la stabilité de l'activité enzymatique "basale" (en absence de CaM).

Nous avons recherché l'existence de la calmoduline dans la fraction S3 de BA et de BP pour 4 crabes différents. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 3 :

	Crabe 1		Crabe 2		Cra	Crabe 3		Crabe 4		S
	BA	BP	BA	BP	BA	BP	ВА	BP	BA	BP
γCaM/g tissu	32,6	41,4	56,2	34,5	53,3	59,0	75,8	81,5	54,4 ± 17,7	54,1 ± 21,0
mg CaM/g prot	0,41	0,41	0,70	0,35	0,67	0,59	0,95	0,82	0,68 ± 0,22	0,54 ± 0,20

 \overline{X} représente la moyenne de la quantité de CaM exprimée par g de tissu ou de protéines, dans la fraction S3 isolée à partir de branchies de 4 crabes différents.

Nos résultats mettent en évidence l'existence d'un activateur "non dialysable" dans la fraction S3; cet activateur est thermostable et l'hypothèse la plus logique est de penser que cette molécule est la calmoduline. La calmoduline est présente aussi bien dans les BA que dans les BP du crabe *E. sinensis*. La comparaison de \overline{X}_{BA} et \overline{X}_{BP} au moyen d'un test "t de Student" nous apprend qu'il n'y a pas de différence significative quant à la quantité de calmoduline contenue dans les BA et les BP, qu'on l'exprime par γ CaM / g tissu ou par mg CaM par g de protéines.

4.2. Activation de l'hydrolyse de l'ATP " par les ions Ca²⁺ et Mg²⁺" dans la branchie de crabe *E. sinensis*.

4.2.1. Introduction

Il existe des protéines capables d'évacuer les ions Na⁺ et Ca²⁺ de la cellule; ce sont les ATPases : en scindant l'ATP et en récupérant l'énergie, ces pompes à calcium à haute affinité permettent l'évacuation de ces ions. Deux types de protéines assurent le transport des ions Ca²⁺ hors de la cellule :

- des ATPases transportant le calcium quand la concentration en Ca²⁺ intracellulaire est élevée; ces enzymes sont souvent appelés phosphatases à faible affinité (Flik et al., 1984).
- des ATPases transportant le calcium quand la concentration cytosolique en Ca²⁺ est faible : ces ATPases sont dites à haute affinité pour le calcium.

Seules les Ca²⁺-APTPases à haute affinité et identifiées comme étant des pompes "actives" au Ca²⁺ voient leur activité contrôlée par la calmoduline (voir introduction).

4.2.2. Stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par les ions calcium

4.2.2.1. Introduction

Le calcium est un ion capable de stimuler l'hydrolyse de l'ATP; en 1983, Flik et al. montrent que le chélation du Ca²⁺ à l'ATP est une condition prérequise pour que les esters d'adénosine phosphate puissent servir de substrat aux phosphatases des membranes plasmiques des branchies. Nous avons mesuré l'hydrolyse de l'ATP en présence de calcium sur un homogénat de branchies antérieures et postérieures d'*Eriocheir sinensis*. L'unité d'activité enzymatique est définie comme étant égale au nombre de µmoles de phosphate inorganique hydrolysée par heure et par gramme d'homogénat : l'activité enzymatique mesurée est identifiée comme une mesure de "l'activité phosphatasique".

	Crabe 1	Crabe 2	Crabe 3	Crabe 4	x
BA (U/g)	1,21	0,94	0,75	1,22	1,03
BP (U/g)	3,72	4,38	4,45	3;16	3,93

<u>Tableau 4</u> : mesure de "l'activité phosphatasique" dans un homogénat de branchies antérieures (BA) et de branchies postérieures (BP) de crabe *E. sinensis*, en présence de CaCl₂.2H₂O 5mM, d'ATP 5 mM, d'un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8. L'incubation dure 60 minutes à 37 ° C. X représente la moyenne des activités enzymatiques d'un homogénat de 4 crabes différents.

Le tableau 4 révèle l'existence d'une activité phosphatasique chez les 4 crabes, et dans leurs deux types de branchies. X illustre clairement la différence d'activité mesurée entre les BA et les BP. Un test "t de Student" montre que la différence entre les activités enzymatiques dans les BA et les BP est hautement significative ($\alpha < 0,001$); nous avons mesuré l'activité phosphatasique sur H mais aussi sur un culot C1 et un surnageant S1 obtenus après centrifugation (100.000 X g) d'un homogénat de branchies (H). Nous avons constaté que toute l'activité phosphatasique se retrouve dans C1 pour nos conditions expérimentales. L'activité mesurée est donc une somme d'ATPases membranaires et d'un "ensemble de phosphatases alcalines" essentiellement de membranes. Si l'activité observée dans le culot C1 de BA de crabes E. sinensis est bien inférieure à celle observée dans le culot de BP (C1P), on peut émettre l'hypothèse que les plissements membranaires apicaux et basolatéraux dans les BP typiques de ces branchies "transportrices" sont enrichies en ATPases membranaires et en phosphatases alcalines des membranes. Nous savons que l'activité "transportrice" d'un épithélium est liée notamment à la présence de la Ca²⁺-ATPase "à haute affinité" au niveau de la face basolatérale de la cellule. L'activité phosphatasique mise en évidence peut-elle être associée à cette

 Ca^{2+} -ATPase ? Nous avons mesuré "l'activité phosphatasique" d'un homogénat de BA et BP en fonction d'une concentration croissante en Ca²⁺.



Le graphique 2 nous apprend que l'activité phosphatasique est plus élevée dans les BP que dans les BA; cette activité n'est pas inhibée par un excès de Ca²⁺ dans les deux types de branchies. Mais nos conditions expérimentales ne nous permettent pas de mettre en évidence une Ca^{2+} - ATPase à haute affinité (Km < 0,5 mM) : nous avons vraisemblablement un ensemble d'ATPases pour le calcium dans des homogénats de BA et BP de crabes *E. sinensis*.

4.2.3. Stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par les ions Mg²⁺.

On sait que l'ion Mg²⁺ est indispensable au fonctionnement de la pompe à Ca²⁺ et des Ca²⁺-ATPases, et que le complexe Mg \sim ATP se lie différemment aux différentes ATPases; il était dès lors intéressant de tester l'influence de cet ion divalent sur l'activité phosphatasique contenue dans un homogénat (H) de BA et BP de crabe *E. sinensis*.



Le graphique 3 montre une activité phosphatasique "Mg²⁺ dépendante" bien plus élevée dans les BP que dans les BA. Contrairement au cas de l'ion Ca²⁺ (graphique 2), on observe une inhibition de cette activité hydrolytique de l'ATP par excès de Mg²⁺, uniquement dans les BP et pour des concentrations en magnésium dépassant 5 mM. L'ion Mg²⁺ permet de différencier le contenu enzymatique des BA et des BP du crabe *E. sinensis*. La conclusion principale est la mise en évidence de l'existence d'un pool de phosphatases différent dans les branchies postérieures et antérieures du crabe *E. sinensis*.

4.2.4. Effets d'inhibiteurs sur l'hydrolyse du Cav ATP ou Mgv ATP.

4.2.4.1. Introduction

Ghijsen et Van Os (1979, 1982), en utilisant divers inhibiteurs à spécificité différente, ont montré que dans les membranes plasmiques de duodenum de rat, l'activité ATPasique dépendante du Ca²⁺ n'est pas homogène; ils ont pu mettre en évidence 2 activités ATPasiques dépendantes du calcium :

- une phosphatase, localisée aussi bien dans les bordures en brosse que dans les membranes basolatérales, qui possède une faible affinité pour le calcium et qui est inhibée par les inhibiteurs spécifiques des phosphatases alcalines (théophylline, L-phénylalanine).
- une autre phosphatase, localisée exclusivement dans les membranes basolatérales, qui possède une haute affinité pour le calcium, qui n'est pas inhibée par la théophylline, mais bien par les antagonistes de la CaM tels que la trifluopérazine et la calmidazolium.

Nous avons testé l'influence de différents inhibiteurs sur "l'activité phosphatasique" dans un homogénat de BA et BP de Crustacé.

4.2.4.2. Effet de la théophylline

La théophylline est un inhibiteur spécifique des phosphatases alcalines; son effet sur un homogénat de BA et BP de crabes *E. sinensis* est présenté au graphique n° 4 :



Act. phosphatasique (U/g).

Théophylline (mM).

<u>Graphique 4</u> : détermination de l'activité phosphatasique dans un homogénat de branchies antérieures (BA -D-) et postérieures (BP -) en fonction de la concentration en théophylline. Tampon Tris-HCI 20 mM pH 8, ATP 5 mM, CaCl₂.2H₂O 5 mM, MgCl₂.6H₂O 2 mM.

On constate que l'activité phosphatasique diminue fortement dans les branchies postérieures en présence de théophylline; par contre, dans les BA, l'activité phosphatasique n'est pas inhibée par la théophylline. Ces résultats confirment l'hypothèse suivant laquelle le contenu enzymatique dans les BP est différent de celui des BA : il y a plus de phosphatases alcalines aspécifiques dans les BP.


Théophylline (mM).

<u>Graphique 5</u> : détermination de l'activité phosphatasique dans le culot C1 (100.000 X g) de branchies antérieures (BA →) et postérieures (BP →) en fonction de la concentration en théophylline. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour la mesure d'activité phosphatasique dans H.

L'effet observé dans le culot obtenu après centrifugation à haute vitesse (C1) confirme cette différence; la sensibilité plus forte dans les BP peut être mise en relation avec la présence de plus de phosphatases alcalines non spécifiques dans le culot dans branchies postérieures.

4.2.4.3. Effet de la cystéine.

Ghijsen et al. (1981) ont montré que les acides aminés et plus particulièrement la L-phénylalanine et la cystéine inhibaient les phosphatases non spécifiques présentant un pH optimum en milieu alcalin. De plus, la cystéine, inhibiteur des phosphatases alcalines, qui agit en liant le Zn^{2+} "intracellulaire", peut inhiber de façon différente l'hydrolyse du Ca \sim ATP et du Mg \sim ATP. L'effet de la cystéine sur l'activité phosphatasique d'un homogénat de branchies antérieures et postérieures de crabes *E; sinensis* est présenté dans les graphiques 6 et 7.



<u>Graphique 6</u>: détermination du pourcentage d'inhibition de l'activité phosphatasique dans un homogénat de branchies antérieures (BA -a-) et postérieures (BP -) en fonction de la concentration en cystéine. Tampon Tris-HCI 20 mM pH 8, ATP 5 mM, CaCl₂.2H₂O 5 mM.

En présence de Ca²⁺ 5 mM, un homogénat de BP est plus "facilement" inhibé qu'un homogénat de BA (voir graphique 6).



Cystéine (mM).

Le graphique 7, par contre, montre qu'en présence de $Mg^{2+} 5 mM$, il n'y a pas de différence dans l'inhibition par le Mg^{2+} entre un homogénat de BA et de BP. On peut dès lors admettre que, uniquement en présence de Ca^{2+} , l'activité phosphatasique des branchies antérieures est plus difficlement inhibée que celle des BP. L'inhibition importante supposerait un pool important de phosphatases alcalines dans les BA et les BP.

4.2.4.4. Effet de la trifluopérazine.

La trifluopérazine (TFP) est une phénothiazine agissant comme un antagoniste de la CaM; sa liaison avec la CaM augmente si on ajoute du calcium dans la solution. Le mode d'action de la TFP sur la CaM a été présenté au point 1.1.5. (figure 3). Souvent, on peut mettre en évidence une activité Ca²⁺- ATPasique de haute affinité dépendante de la calmoduline, en utilisant cette propriété de la TFP d'inhiber la Ca²⁺-ATPase (Flik, 1984).



TFP (µM).

<u>Graphique 8</u> : détermination de l'activité phosphatasique dans un homgénat de branchies antérieures (BA ⁻D⁻) et postérieures (BP -) en fonction de la concentration en trifluopérazine, en présence d'ATP 5 mM, de CaCl₂.2H₂O 5 mM, de MgCl₂.6H₂O 2 mM et de Tris-HCl 20 mM pH 8.

Le graphique 8 montre que :

- la TFP a un effet inhibiteur sur l'homogénat de BA et de BP de crabes E. sinensis .

- Cet effet est plus marqué si on utilise les branchies postérieures.

Cet effet de la trifluopérazine pourrait laisser supposer l'existence de CaM dans la fraction H de branchies postérieures et antérieures. Cette CaM liée à la TFP voit son activité biologique bloquée, et, puisque la TFP inhibe l'hydrolyse de Ca \sim ATP, on peut penser que les BP , plus que les BA, contiennent des Ca²⁺-ATPases à haute affinité, et sensibles àla CaM. L'effet est confirmé si on utilise la fraction C1 :



TFP (µM).

<u>Graphique 9</u>: détermination de l'activité phosphatasique dans le culot C1 (100.000 X g) de BA (→) et de BP (→) en fonction de la concentration en trifluopérazine, en présence du milieu d'incubation suivant : - tampon Tris-HCl 20 mM pH 8 - CaCl₂.2H₂O 5 mM

- MgCl₂.6H₂O 2 mM
- ATP 5 mM

On constate que la trifluopérazine a aussi un effet sur l'activité phosphatasique contenue dans le C1 des branchies antérieures et le C1 des branchies postérieures. Nous pensons que l'effet inhibiteur de la TFP sur la fraction "membranaire" est notamment lié à la présence de Ca²⁺-ATPase à haute affinité et sensible à la calmoduline, dans les BA et les BP.

4.2.4.5. Effet du calmidazolium

Gietzen, en 1981, a montré que le calmidazolium (R24571) est un inhibiteur beaucoup plus spécifique de la $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ ATPase (ou pompe à calcium), dépendante de la calmoduline, que la TFP, qui à concentration élevée, peut inhibber l'hydrolyse de Ca \sim ATP en modifiant l'intégrité membranaire. L'effet du R24571 est mesuré sur des homogénats de BA et de BP de crabes *E. sinensis* :



Act. phosphatasique (U/g).



<u>Graphique 10</u>: détermination de l'activité phosphatasique dans un homogénat de BA (-D-) et de BP (-) en fonction de la concentration en calmidazolium (R24571). Le milieu d'incubation comprend du Tris-HCl 20 mM pH 8, du CaCl₂.2H₂O 5 mM, du MgCl₂.6H₂O 2 mM et de l'ATP 5 mM.

On constate sur le graphique 10 que, d'une part, le R24571 n'inhibe pas ou peu l'hydrolyse du Ca \sim ATP dans un homogénat de branchies antérieures, que, d'autre part, l'effet inhibiteur est important sur les branchies postérieures. Ces effets sont confirmés en utilisant un culot C1 obtenu après centrifugation à haute vitesse (100.000 X g) d'un homogénat de BA ou BP, comme le montre le graphique 11 :





<u>Graphique 11</u>: détermination de l'activité phosphatasique dans le culot C1 (100.000 X g) de BA (→) et BP (→) en fonction de la concentration en R24571. Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour le traitement de l'homogénat.

On retrouve une très faible inhibition de l'activité phosphatasique par le R24571, dans les BA de crabes *E. sinensis*. L'effet du calmidazolium est nettement plus marqué dans le culot C1 des branchies postérieures et tout particulièrement à des concentrations en inhibiteurs inférieures à 1 μ M.

4.3. Mise en évidence de PDE_{AMPc} dépendante du complexe Ca²⁺-CaM dans les branchies du crabe *E. sinensis* : effet de la calmoduline

4.3.1. Introduction

Il existe plusieurs types de phosphodiestérases de l'AMPc (PDE_{AMPc}) avec des propriétés cinétiques différentes. Pour de nombreux tissus, l'activité "PDE" se retrouve dans la fraction soluble et particulaire de la cellule, bien que souvent plus de 90 % de cette activité se retrouve dans la fraction soluble. De façon générale, on peut séparer cette "activité" soluble en trois types enzymatiques structurellement et cinétiquement différents : la fraction A1 - PDE possède une haute affinité pour l'AMPc avec une sensibilité nulle au calcium et à la calmoduline. Les deux autres formes de la PDE, nommées G1A - PDE et G2A - PDE, ont des propriétés fonctionnelles différentes de la A1 - PDE; elles hydrolysent aussi bien l'AMPc que le GMPc avec une faible affinité. L'activité G1A - PDE est stimulée de façon dépendante du calcium par la calmoduline, mais n'est pas affectée par le Ca²⁺ seul. Au contraire, l'activité G2A -PDE est très sensible au calcium mais ne peut pas être stimulée par la calmoduline. L'enzyme sensible de la calmoduline en présence de Ca²⁺ (10⁻⁶ M) peut être un élément important dans le contrôle des activités cellulaires par le calcium et l'AMPc.

Nous avons réalisé le dosage e la PDE_{AMPc} sur un homogénat de branchies antérieures et postérieures de 4 crabes différents; les résultats sont présentés au tableau 5.

4.3.2. Résultats

	BA (U/g)		BP (U/g)	
	- CaM	+ CaM	- CaM	+ CaM
Crabe 1	66,2	81,9	82,4	117,8
Crabe 2	71,3	96,2	77,9	135,5
Crabe 3	91,9	120,4	172,2	214,9
Crabe 4	92,8	111,6	182,3	212,1
₹±S	80,6 <u>+</u> 13,8	102,5 <u>+</u> 17,0	103,7 ± 63,3	170,1 ± 50,7

<u>Tableau 5</u>: mise en évidence de la phosphodiestérase hydrolysant l'AMPc et dépendante du complexe Ca²⁺-CaM dans un homogénat de BA et de BP : effet de la calmoduline. Les conditions expérimentales sont : tampon sucrose 0,25 M, imidazole-HCI 50 mM, pH 7,4, EGTA 1 mM; CaCl₂ 20 mM, H³-AMPc (O,25 μCi / test), CaM (188 ng / ml). L'incubation a lieu à 30°C pendant 30 minutes.

Nous mettons pour la première fois en évidence la présence de PDE_{AMPc} dans les branchies de crabes *E. sinensis* adaptés à l'eau douce. L'activité moyenne (\overline{X}) exprimée en U / g de tissu dans les BA n'est pas significativement différente de celle retrouvée dans les BP; un test "t de Student" le prouve (les écarts-type sont présentés au tableau 5). On constate également que la calmoduline, à une concentration de 0,188 γ / mg, stimule de façon significative l'activité de la PDE_{AMPc} dans les BA et les BP.

Chapitre V : Discussion et conclusions générales

De nombreux travaux montrent que le transport calcique est lié à l'activité de la pompe ionique, laquelle dépend de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire et peut être sensible à la calmoduline. Ainsi, Fenwick, en 1976, suggère que les ATPases dépendantes du calcium et identifiées dans les branchies de certaines espèces euryhalines, pourraient réguler des échanges calciques. Ansah et al., en 1984, montrent qu'il existe une activité Ca²⁺-ATPase dans les membranes plasmiques de cellules acineuses pancréatiques de rat, et que la calmoduline (CaM) augmente la sensibilité au calcium de ce système enzymatique en présence de Mg²⁺. Flik et al. (1984) démontrent l'existence d'une Ca²⁺-ATPase à haute affinité pour le calcium et dépendante de la calmoduline. En 1985, Flik et al., à partir de préparations membranaires de Cichlidés, présentent un modèle pouvant expliquer le transport actif transépithélial de calcium dans les branchies postérieures; c'est une ATPase, activable par la calmoduline, qui interviendrait dans la sortie du calcium vers le fluide extracellulaire. Bref, de nombreux travaux montrent l'importance de la calmoduline dans la régulation du transport calcique transépithélial.

Nous avons trouvé très intéressant de doser la CaM dans les branchies antérieures et postérieures du crabe *Eriocheir sinensis*, ces branchies étant un bon modèle pour expliquer l'osmorégulation chez les Crustacés. En effet, les BA et les BP du crabe étudié possèdent chacun un type d'épithélium structurellement et fonctionnellement différent : l'épithélium des BA est de type respiratoire et non transporteur d'ions, alors que l'épithélium des BP possède un épithélium épais de type transporteur d'ions. Cette différence de structure et de fonction n'est marquée que pour les crabes euryhalins adaptés à l'eau douce. C'est pour cette raison que nous avons désiré étudier le comportement de l'activité phosphatasique (identifiée à l'activité Ca²⁺-ATPasique) sur ce type de crabe. Nous avons voulu voir si la variation de structure branchiale ne pouvait pas s'expliquer par une différence d'activité "transportrice" (une activité Ca²⁺ Mg²⁺ ATPase et Na⁺ K⁺ ATPase plus élevée dans les BP, possédant un plus grand nombre de "sites de transport ").

Le transport du Ca²⁺est lié à l'activité de la pompe ionique dépendant de la concentration en calcium intracellulaire qui, en se liant à la calmoduline, peut moduler l'AMPc intracellulaire (et donc la réponse hormonale) en activant la PDE_{AMPc} (voir 1.3.1.1.). L'essentiel de notre travail consistait à mettre en évidence la calmoduline. Nous avons dosé la CaM en utilisant la capacité que possède cette protéine thermostable de stimuler la PDE_{AMPc} . Il n'a cependant pas été facile de mettre au point ce dosage; en effet, la PDE_{AMPc} de mammifère utilisée dans ce dosage, en absence de CaM, voit son activité diminuer très rapidement au cours du temps.

C'est ici que le **glycérol** s'est révélé être un outil indispensable à la mise en évidence de la calmoduline. Nous avons aussi constaté que l'effet activateur de la CaM diminue également au cours du temps et dépend de l'activité "basale". De nombreux essais ont montré que le glycérol, en stabilisant l'activité basale, maintient l'effet activateur de la CaM. Un fractionnement subcellulaire effectué par centrifugation différentielle permet d'utiliser une fraction "non dialysable" appelée S3. Cette fraction contient un activateur thermostable non dialysable. Nous avons dosé la calmoduline dans les BA et les BP de crabes *E. sinensis* adaptés à l'eau douce; les résultats montrent que la CaM est présente aussi bien dans les BA que dans les BP, et qu'il n'y a pas de différence significative quant à la quantité de calmoduline contenue dans les deux types de branchies.

C'est, à notre connaissance, **la première fois** que l'on met en évidence la présence de CaM dans un homogénat de branchies de crustacés. La présence de calmoduline dans un organe osmorégulateur soulève l'intérêt d'envisager la signification physiologique de la présence de cette molécule. Les rôles physiologiques de la CaM sont nombreux : la calmoduline régule le niveau des nucléotides cycliques par activation de la PDE_{AMPc} et par stimulation de l'adénylate (et guanylate) cyclase. La CaM contrôle par exemple la motilité cellulaire; elle interviendrait également dans la régulation du métabolisme du glycogène. Elle peut activer la NAD kinase de plantes

(molécule chargée du contrôle des niveaux de NADP⁺). Nous avons choisi d'étudier le rôle de la calmoduline sur l'hydrolyse du

Ca \sim ATP ainsi que son rôle sur la régulation de la PDE hydrolysant l'AMPcyclique (et dépendante du complexe Ca²⁺-CaM) dans un organe impliqué dans la régulation du transport ionique.

A cette fin, nous avons recherché une activité phosphatasique dans un homogénat (H) et dans une fraction sédimentable (C1) de BA et de BP de crabes *E. sinensis*. Les résultats montrent que cette activité phosphatasique est présente dans l'homogénat des BA et des BP, mais est significativement plus élevée dans les BP.

On s'est aperçu que toute l'activité phosphatasique mesurée dans l'homogénat se retrouvait dans C1. Il semble donc que l'activité mesurée représente la somme d'un ensemble membranaire d'ATPases. En étudiant l'influence du Ca²⁺ et du Mg²⁺ sur l'hydrolyse de l'ATP, nous n'avons pas pu mettre en évidence une activité Ca²⁺-ATPase "transportrice" (de haute affinité); cependant, nous observons une différence de comportement entre les BA et les BP, notamment dans la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par les Mg²⁺.

L'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases, tels que la cystéine ou la théophylline, aurait pu nous permettre de mettre en évidence une activité ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$) ATPase dépendante de la calmoduline.

Si, en présence de théophylline ou de cystéine, l'activité phosphatasique mesurée est plus forte dans les BP par rapport aux BA, c'est probablement parce qu'il y a plus de phosphatases alcalines aspécifiques dans les BP. On sait que l'épithélium des BP contient des membranes apicales et basolatérales qui possèdent des replis, cette structure pouvant être liée à l'importante activité phosphatasique observée dans les BP.

Par contre, la sensibilité de l'activité phosphatasique à la trifluopérazine (antagoniste de la calmoduline) pourrait signifier que nous sommes en présence d'un

effet inhibiteur "dépendant de la calmoduline" ou de la présence de Ca²⁺-ATPases CaM dépendantes. On sait cependant que la TFP peut modifier l'environnement membranaire et inhiber les ATPases indépendemment de son pouvoir antagoniste vis-à-vis de la calmoduline.

L'effet du R24571, antagoniste "plus spécifique" de la calmoduline sur H et C1 de BA et de BP, est significatif : il y a une forte inhibition dans les branchies postérieures, alors que l'effet de l'inhibiteur est faible sur les branchies antérieures; on fera ici une corrélation entre ces observations et le nombre de "sites de transport" Ca^{2+} -ATPase dépendante de la CaM dans les deux types de branchies.

Grâce au calmidazolium, nous avons peut-être mis au point un test qui permet, dans un "pool de phosphatases alcalines", de retrouver des Ca²⁺-ATPases à haute affinité; comme l'inhibition par l'ouabaïne de la Na⁺ K⁺ ATPase révèle la pompe sodico-potassique, l'inhibition de l'hydrolyse de Ca \sim ATP par le R24571 révèle peut-être la présence de la pompe à calcium.

Nous avons finalement dosé la PDE hydrolysant l'AMPc, régulée par le complexe Ca²⁺-CaM : d'une part les résultats montrent l'existence de PDE_{AMPc} dans l'homogénat de BA et de BP (mais en quantité plus élevée dans les BP), d'autre part, la CaM se révèle capable d'activer cette CaM-BP dans les deux types de branchies.

La calmoduline n'a donc pas un rôle physiologique unique dans la branchie : elle peut réguler l'activité phosphatasique dépendant du Ca²⁺ mais est aussi capable de jouer un rôle de façon indirecte sur le contrôle du niveau d'AMPc, par l'intermédiaire d'une activation de la PDE_{AMPc}. Nous avons pu mettre en évidence un pool important de phosphatases alcalines non spécifiques dans un homogénat de BA et de BP d'*E. sinensis*. Ces phosphatases peuvent être localisées dans la partie apicale de l'épithélium, et les sites de transport dans la partie basolatérale. Il serait a priori intéressant de rechercher un système permettant de séparer la partie apicale et basolatérale de l'épithélium des deux types de branchies afin de mieux "localiser" la pompe à Ca²⁺.

D'autre part, l'enrichissement d'une fraction subcellulaire en "pompe à calcium" permettra de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de cette "pompe" par la calmoduline.

En 1988, Wingst a montré que l'activité de la Na⁺ K⁺ ATPase peut être sensible aux variations physiologiques de calcium intracellulaire. Des protéines cytosoliques comme la calmoduline, la calnaktine et la protéine kinase C pourraient réguler la pompe (via des phosphorylations) durant ces changements transitoires de concentration en Ca²⁺ intracellulaire. Les mécanismes d'interaction de ces protéines avec les pompes Na⁺ K⁺ ATPases ne sont pas encore déterminés. Il serait intéressant de voir si, chez les Crustacés euryhalins, une protéine comme la CaM peut intervenir dans le contrôle de la pompe sodico-potassique pendant les variations de concentration en calcium cytosolique.

Bibliographie

- ANDERSON, J.M., and CORMIER, M.J. (1978). *Calcium-dependent regulator of NAD kinase in higher plants*. Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>84</u>, 595-602.
- ANDERSON, J.M., and CORMIER, M.J. (1979). Isolation of calcium-dependent modulator protein from higher plants and fungi. Fed. Proc.; Fed. Am. Soc. Exp. Biol. <u>38</u>, 478.
- ANSAH, T.A., MOLLA, A., and KATZ, S. (1984).
 Ca²⁺-ATPase Activity in Pancreatic Acinar plasma membranes. Regulation by calmodulin and acidic phospholipids.
 J. of Biol. Chem. <u>259</u>, pp. 13442-13450.
- ARELLANO, R.O., RAMON, F., RIVERA, A., and ZAMPIGHI, G.A. (1988).
 Calmodulin acts as an intermediary for the effects of calcium on gap junctions from crayfish lateral axons.
 The Journal of Membrane Biology, <u>101(2)</u>, 119-133.
- BARRA, J.A., PEQUEUX, A., HUMBERT, W. (1983). A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. Tissue and cell. <u>15</u> (4) : 583-596.
- BIELAWSKI, J. (1971). Ultrastructure and ion transport in gill epithelium of the crayfish, Astacus leptodactylus. Esch. Protoplasma <u>73</u>: 177-190.
- BULGER, R.E. (1963).
 Fine structure of the rectal (Salt-secreting) gland of the spiny dogfish, Squalus acanthias.
 Anat. Rec. <u>147</u>: 95-127.
- CHEUNG, W.Y. (1969).
 Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Preparation of a partially inactive enzyme and its subsequent stimulation by snake venom.
 Biochim. Biophys. Acta, <u>191</u>, 303-315.

- CHEUNG, W.Y. (1970). *Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator.* Biochim. Biophys. Res. Commun. <u>38</u>, 533-538.

- CHEUNG, W.Y. (1971a). Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Evidence for and properties of a protein activator.
 - J. Biol. Chem. 246, 2859-2869.
- CHEUNG, W.Y. (1971b). Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Effect of divalent cations. Biochim. Biophys. Acta, 242, 395-409.
- CHEUNG, W.Y., LYNCH, T.J., and WALLACE, R.W. (1978) An endogenous Ca²⁺-dependent activator protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 9, 233-251.
- COPELAND, D.E. (1968). Fine structure of salt and water uptake in the land-crab Gecarcinus lateralis. Am. Zool. 8: 417-432.
- DE COUET, H.G., JABLONSKI, P.P., and PERKIN, J.L. (1986). Calmodulin associated with rhabdomeral photoreceptor microvilli of arthropods and squid. Cell. Tissue Res. 244, 315-319.
- DEDMAN, J.R., POTTER, J.D., JACKSON, R.L., JOHNSON, D., and MEANS, A.R. (1977).

Physiochemical properties of rat testis Ca²⁺-dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 252, 8415-8422.

- DEDMAN, J.R., JACKSON, R.L., SCHREIBER, W.E., and MEANS, A.R. (1978) Sequence homology of the Ca²⁺-dependent regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat testis with other Ca²⁺-binding proteins. J. Biol. Chem. 253, 343-346.

- DONEEN, B.A. (1981).

Effects of Adaptation to sea water, 170 % sea water and to fresh water on Activities and Subcellar distribution of branchial Na⁺-K⁺, ATPase, Low - and High affinity Ca²⁺-ATPase, and ouabaine insensitive ATPase in Gillichtys mirabilis. J. Comp. Physiol. 145 : 51-61.

- EGRIE, J.C., CAMPBELL, J.A., FLANGAS, A.L., and SIEGEL, F.L. (1977). Regional cellular and subcellular distribution of calcium - activated cyclic nucleotide phosphodiesterase and calcium-dependent regulator in porcine brain. J. Neurochem. 28, 1207-1213.

 ENGEL, D.W., FERGUSON, R.L., EGGERT, L.D. (1975). Respiration and ATP concentrations in the excised gills of the blue crab as a function of salinity.

Comp. Biochem. Physiol. <u>42A</u> : 669-673.

- EVERS, C., HUGENTOBLER, G., LESTER, R., GMAJ, P., MEIER, P., and MURER, H. (1988).

ATP-dependent Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation in basolateral liver plasma membranes. Bioch. and Biophys. Acta <u>939</u>, 542-550.

_____, ____, _

- FENWICK, J.L. (1976).

Effect of stanniectomy on calcium activated adenosinetriphosphatase activity in the gills of fresh water adapted North American eels, Anguilla rostrata Le Sueur. Gen. Comp. Endocr. <u>29</u>, 383-387.

FLIK, G., BONGA, S.E.W., and FENWICK, J.C. (1983).
 Ca²⁺-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes I. Identification of Ca²⁺-activited ATPases activities with non-specific phosphatase activities.

Comp. Biochem. Physiol. <u>76B</u>, nº 4, pp. 745-754.

- FLIK, G., BONGA, S.E.W., and FENWICK, J.C. (1984).
 Ca²⁺-dependent phosphatase and Ca²⁺-dependent ATPase activities in plasma membranes of cel gill epithelium II. Evidence for transport high-affinity Ca²⁺-ATPase.
 Comp. Biochem. Physiol. <u>79B</u>, n° 1, pp. 9-16.
- FLIK, G., VAN RIJS, J.H., and BONGA, S.E.W. (1985).
 Evidence for high-affinity Ca²⁺ATPase activity and ATP-driven Ca²⁺-transport in membrane preparations of the gill epithelium of the Cichlid fish Oreochromis mossambicus.
 J. Exp. Biol. <u>119</u>, 335-347.
- GERARD, J.F., GILLES, R. (1972).
 The free amino-acid pool in Callinectus sapidus (Rathbun) tissues and its role in the osmotic intracellular regulation.
 J. Exp. Biol. Ecol. <u>10</u>: 125-136.
- GHIJSEN, W.E.J.M., DE JONG, M.D., and VAN OS C.H. (1980).
 Dissociation between Ca²⁺-ATPase and alkaline phosphatase activities in plasma membranes of rat duodenum.
 Bioch. and Biophys. Acta, <u>599</u> : 538-551.

GHIJSEN, W.E.J.M., DE JONG, M.D., and VAN OS, C.H. (1982).
 ATP-dependent calcium transport and its correlation with Ca²⁺-ATPase activity in basolateral plasma membranes of rat duodenum.
 Biochem. and Biophys. Acta, <u>689</u> : 327-336.

- GIETZEN, K., MANSARD, A., and BADER, H. (1980).
 Inhibition of human erythrocyte Ca²⁺-transport ATPase by phenothiazines and butyrophenones.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>94</u>, 674-681.
- GIETZEN, K., WÜTHRICH, A., and BADER, H. (1981).
 R24571 : A new powerful inhibitor of red blood cell Ca²⁺-transport ATPase of Calmodulin regulated functions.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>101</u>, 418-425.
- GILLES, R., PEQUEUX, A. (1981).
 Cell volume regulation in crustaceans : Relationship between mechanisms for controlling the osmolality of extracellular and intracellular fluids.
 J. Exp. Zool. <u>215</u> : 351-362.
- GNEGY, M.E., NATHANSON, J.A., and UZUNOV, P. (1977).
 Release of the phosphadiesterase activator by cyclic AMP-dependent ATP : Protein phosphotransferase from subcellular fractions of rat brain.
 Biochem. Biophys. Acta. <u>497</u>, 75-85.
- GOPINATH, R.M., and VINCENZI, F.F. (1977).
 Phosphodiesterase protein activate mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca²⁺Mg²⁺) ATPase.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>77</u>, 1203-1209.
- GRAF, F. (1978). Les sources de calcium pour les Crustacés venant de la mer. Arch. Zool. exp. gen. <u>119</u>, 143-161.
- GRAND, R.J.A., and PERRY, S.V. (1978).
 The amino acid sesuence of the troponin C-like protein (modulator protein) from bovine uterus.
 FEBS Lett. <u>92</u>, 137-142.
- HIDAKA, H., YAMAKI, T., TOTSUKA, T., and ASANO, M. (1979).
 Selective inhibitors of Ca²⁺ binding modulator of phosphodiesterase produce vascular relaxation and inhibit action-myosin interaction.
 Mol. Pharmacol. <u>15</u>, 49-59.
- HO, S.M., and CHAN, D.K.O. (1980). Branchial ATPases and ionic transport in the cell Anguilla japonica. II. Ca²⁺-ATPase. Comp. Biochem. Physiol. <u>67B</u>, 639-645.
- ILUNDAIN, A., and NAFTALIN, R.J. (1979). *Role of Ca²⁺-dependent regulator protein in intestinal secretion.* Nature (London) <u>279</u>, 446-448.

- JAMIESON, G.A. Jr, VANAMAN, T.C., and BLUM, J.J. (1979). Presence of calmodulin in Tetrahymena. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. <u>76</u>, 6471-6475.
- JARRETT, H.W., and PENNISTON, J.T. (1977).
 Partial purification of the Ca²⁺Mg²⁺ATPase activator from human erythrocytes : Its similarity to the activator of 3' : 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>77</u>, 1210-1216.
- JONES, H.P., MATTHEWS, J.C., and CORMIER, M.J. (1979).
 Isolation and characterization of Ca²⁺-dependent modulator protein from the marine invertebrate Renilla reniformis.
 Biochemistry <u>18</u>, 55-60.
- KAKIUCHI, S., and YAMAZAKI, R. (1970).
 Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. III. Studies on cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>41</u>, 1104-1110.
- KAKIUCHI, S., YAMAZAKI, R., and TESHIMA, Y. (1971).
 Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiestrase. IV. Two enzymes with different properties from brain.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>42</u>, 968-974.
- KLEE, C.B. (1977). Conformational transition accompanying the binding of Ca²⁺ to the protein activator of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. Biochemistry <u>16</u>, 1017-1024.
- KLEVIT, R.E., LEVINE, B.A., and WILLIAMS, R.J.P. (1981).
 A study of calmodulin and its interaction with trifluoperazine by high resolution ¹H NMR spectroscopy.
 FEBS Lett. <u>123</u>, 25-29.
- KOBAYASHI, R., TAWATA, M., and HIDAKA, H. (1979).
 Ca²⁺ regulated modulator protein interacting agents : inhibition of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of human erythrocyte ghost.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>88</u>, 1037-1045.
- KOCH, H.J. (1934).
 Essai d'interprétation de la soi-disant réduction vitale des sels d'argent par certains organes d'Arthropodes.
 Ann. Soc. Sci. Med. Nat. Brux., Ser. B, <u>54</u> : 346-361.
- KRETSINGER, R.H. (1976). *Calcium binding proteins.* Annu. Rev. Bioch. <u>45</u>, 239-266.

- KROGH (1938).
 The active absorption of ions in some fresh water animals.
 Z. Vgl. Physiol. <u>25</u> : 335-350.
- KROGH, A. (1939). Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- KUZNICKI, J., KUZNICKI, L., and DRABILOKOWSKI, W. (1979). Ca²⁺-binding modulator protein in protozoa and myxomycetes. Cell. Biol. In. Rep. <u>3</u>, 17-23.
- LARSEN, F.L., RAESS, B.U., HINDS, T.R., and VINCENZI, F.F. (1978).
 Modulator binding protein antagonizes activation of (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase and Ca²⁺ transport of red blood cell membranes.
 J. Supramol. Struct. <u>9</u>, 269-274.
- LEVIN, R.M., and WEISS, B. (1977). Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Mol. Pharmacol. <u>13</u>, 690-697.
- LIN, Y.M., LIU, Y.P., and CHEUNG, W.Y. (1974).
 Cyclic 3'-5'-nucleotide phosphodiesterase. Purification, characterization and active from of the protein activator from bovine brain.
 J. Biol. Chem. <u>249</u>, 4943-4954.
- LIN, Y.M., LIU, Y.P., and CHEUNG, W.Y. (1974b).
 Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Purification, characterization and active from of the protein activator from bovine brain.
 J. Biol. Chem. <u>249</u>, 4943-4954.
- LIN, Y.M., LIU, Y.P., and CHEUNG, W.Y. (1975).
 Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase. Ca²⁺-dependent formation of bovine enzyme-activator complex.
 FEBS Lett. <u>49</u>, 356-360.
- LIN, C.T., SUN, D., SONG, G.X., and WU, J.Y. (1986). *Calmodulin : Localization in plant tissues.* The Journal of Histochem. and Cytochem., <u>34</u>, n° 5, pp. 561-567.
- LINDWALL, G., and COLE, R.D. (1984). *Phosphorylation affects the ability of Tau to promote microtubule assembly.* Journal of Biological Chemistry <u>259</u> : 5301-5305.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. <u>193</u>, 265-275.

- MA, S.W.Y., SHAMI, Y., and COPP, D.H. (1974). *Properties of Ca²⁺-ATPase from the gill of rainbow trout Salmo gairdneri.* Biochim. Biophys. Acta <u>345</u>, 243-251.
- MORISHIWA, I., and BODNARYK, R.P. (1985). *Amino acid composition of insect calmodulins lacking trimethyllysine*. Comp. Biochem. Physiol., <u>80B</u>, n° 3, pp. 419-423.
- MUTO, S., and MIYACHI, S. (1977). *Properties of a protein activator of NAD kinase from plants.* Plant. Physiol. <u>59</u>, 55-60.
- NEUFELD, G.J., HOLLUDAG, C.W., and PRITCHARD, J.B. (1980). Salinity adaptation of gill Na.K-ATPase ine the blue crab Callinectes sapidus. J. Exp. Zool. <u>211</u> : 215-224.
- OROSZ, F., CHRISTOVA, T.Y., and OVADI, J. (1988).
 Functional <u>in vitro</u> test of calmodulin antagonist : effect of drugs on interactions between calmodulin and glycolytic enzymes.
 Mol. Pharmacol. <u>33</u>, 678-682.
- PEQUEUX, A., and GILLES, R. (1978).
 Na⁺ / NH₄⁺ co-transport in isolated perfused gills of the chinese crab Eriocheir sinensis acclimated to fresh water.
 Experientia <u>34</u> : 1593-1594.
- PEQUEUX, A., and GILLES, R. (1981).
 Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the chinese crab Eriocheir sinensis.
 J. Exp. Biol. <u>92</u> : 173-186.
- PEQUEUX, A., and GILLES, R. (1988).
 The transepithelial potential difference of isolated perfused gills of the chinese crab Eriocheir sinensis acclimated to fresh water.
 Comp. Biochem. Physiol. <u>89A</u>, n° 2, pp. 163-172.
- PEQUEUX, A., CHAPELLE, S., WANSON., GOFFINET, G., and FRANCOIS, C. (1983). (Na⁺-K⁺) ATPase activity and phospholipid content of various fractions of the posterior gills of Carcinus maenas and Eriocheir sinensis. Mar. Biol. Lett. <u>4</u>: 267-279.
- PEQUEUX, A., MARCHAL, A., WANSON, S., and GILLES, R. (1984).
 Kinetics characteristics and specific activity of gill (Na⁺ + K⁺) ATPase in the euryhaline chinese crab, Eriocheir sinensis during salinity acclimatation. Mar. Biol. Lett., in the press.

- PIASCIK, M.T., WISLER, P.L., JOHNSON, C.L., and POTTER, J.D. (1980).
 Ca²⁺-dependent Regulation of Guinea Pig brain Adenylate cyclase.
 J. Biol. Chem. <u>255</u>, 4176-4181.
- ROBERTSON, J.D. (1960). Ionic regulation in the crab Carcinus maenas (L.) in relation to the moulting cycle. Comp. Biochem. Physiol. <u>1</u>, 183-212.
- ROCHETTE-EGLY, C., GARAUD, J.Cl., KEDINGER, M., and HEFFEN, K. (1986). *Calmodulin in epithelial intestinal cells during rat development.* Experientia <u>42</u>, pp. 1043-1047.
- ROUFOGALIS, G.D. (1979). *Regulation of calcium translocation across the red blood cell membrane*. Can. J. Physiol. Pharmacol. <u>57</u>, 1331-1349.
- SCHATZMANN, H.J. (1966). ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. Experientia 22, 364-365.
- SCHATZMANN, H.J. (1975). Active calcium transport and Ca²⁺-activated ATPase in human red cells. Curr. top. Membr. Transp. <u>6</u>, 125-168.
- SCHOFFENIELS, E., and GILLES, R. (1970).
 Osmoregulation in aquatic arthropods in "chemical zoology".
 (Florkin, M., SCHEER, B.T. Eds.).
 Vol. V; Part. A. Academic Press, New York, pp. 255-286.
- SCHULMAN, H., and GREENGARD, P. (1978a).
 Stimulation of brain protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat stable protein.
 Nature (London) <u>271</u>, 478-479.
- SCHULMAN, H., and GREENGARD, P. (1978b).
 Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "Calcium-dependent regulator".
 Proc. Natl. Acad. sci. U.S.A. <u>75</u>, 5432-5436.
- SHAW, J. (1960).
 The absorption of chloride ions by the crayfish. Astacus pallipes Lereboullet.
 J. Exp. Biol. <u>37</u>: 557-572.
- SMOAKE, J.A., SONG, S.Y., and CHEUNG, W.Y. (1974).
 Cyclic 3', 5'-nucléotide phosphodiesterase distribution and developmental changes of the enzyme and its protein activator in mammalian tissues and cells.
 Biochem. Biophys. Acta <u>341</u>, 402-411.

- SOBUE, K., ICHIDA, S., YOSHIDA, H., YAMAZAKI, R., and KAKIUCHI, S. (1979).
 Occurence of a Ca⁺⁺ and modulator protein-activable ATPase in the synaptic plasma membranes of brain.
 FEBS Lett. 99, 199-202.
- SUGDEN, M.C., CHRISTIE, M.R., and ASHCROFT, S.J.H. (1979).
 Presence and possible role of calcium-dependent regulator (Calmodulin) in rat islets of Langerhans.
 FEBS Lett. <u>105</u>, 95-100.
- TEO, T.S., and WANG, J.H. (1973).
 Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions.
 J. Biol. Chem. <u>248</u>, 5950-5955.
- TOWLE, D.W., PLAMER, G.E., and HARRIS, J.L. (1976).
 Role of gill Na⁺ + K⁺ dependent ATPase in acclimatation of blue crab Callinectes sapidus to low salinity.
 J. Exp. Zool. <u>196</u> : 315-322.

 VANAMAN, T.C., SHARIEF, F., and WATTERSON, D.M. (1977). Structural homology between brain modulator protein and muscle TnCs. InCalcium Binding proteins and calcium Function.
 (R.H. WASSERMAN, R.A. CORRADINO, E. CARAFOLI, R.H. KRETSINGER, D.A. Mc CLENNAN, and F.L. SIEGEL, eds.), pp. 107-116. Am. Elsevier, New York.

- VINCENZI, F.F., and HINDS, T.R. (1976). *Plasma membrane calcium transport and membrane-bound enzymes.* Enzymes. Bio. Membr. <u>2</u>, 261-281.
- VINCENZI, F.F., and LARSEN, F.L. (1980). *The plasma membrane calcium pump : regulation by a soluble Ca*²⁺ *binding protein.* Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. <u>32</u>, 2427-2431.
- WAISMAN, D.M., STEVENS, F.C., and WANG, J.H. (1978). *Purification and characterization of a Ca*²⁺-*binding protein in Lumbricus terrestris.* J. Biol. Chem. <u>253</u>, 1106-1113.
- WAISMAN, D.M., SINGH, T.J., and WANG, J.H. (1978a). A modulator-dependent protein kinase from rabbit sketetal muscle. Fed. Proc. <u>37</u>, 1303.

 WALLACE, R.W., LYNCH, T.J., TALLANT, E.A., and CHEUNG, W.Y. (1978). An endogenous inhibitor protein of brain adenylate cyclase and cyclic mucleotide phosphodiesterase. Arch. Biochem. Biophys. <u>187</u>, 328-334.

- WALLACE, R.M., and CHEUNG, W.Y. (1979). Antibody against bovine brain calmodulin cross-reacts with cotton seed calmodulin. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. <u>38</u>, 478.
- WANSON, S., PEQUEUX, A. and CERAY, C. (1983).
 Effect of salinity changes on adenylate energy charge in gills of two euryhaline crabs.
 Arch. internat. Physiol. Bioch. <u>91(</u>2) : B81-B82.
- WATTERSON, D.M., and VANAMAN, T.C. (1976).
 Affinity chromatography purification of a cyclic nucleotide phosphodiesterase using immobilized modulator protein, a troponin C-like protein from brain.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>73</u>, 40-46.
- WATTERSON, D.M., SHARIEF, F.S., and VANAMAN, T.C. (1980).
 The complete amino acid sequence of the Ca²⁺-dependent modulator protein (Calmodulin) of bovine brain.
 J. Biol Chem. <u>255</u>, 962-975.
- WESCOTT, K.R., LAPORTE, D.C., and STORM, D.R. (1979).
 Resolution of adenylate cyclase sensitive and insensitive to Ca²⁺ and Calcium dependent regulatory protein (CDR) by CDR-sepharose affinity chromatography.
 Proc. Natl. Acad. sci. U.S.A. <u>76</u>, 204-208.
- WOLFF, D.J., and SIEGEL, F.L. (1972). *Purification of a calcium-binding phosphoprotein from pig brain.* J. Biol. Chem. <u>247</u>, 4180-4185.
- WOLFF, D.J., and BROSTROM, C.O. (1974). Calcium-binding phosphoprotein from pig brain : identification as a calcium dependent regulator of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase. Arch. Biochem. Biophys., 349-358.
- WOLFF, D.J., POIRIER, P.G., BROSTROM, C.O., and BROSTROM, M.A. (1977). Divalent cation binding properties of bovine brain Ca²⁺-dependent regulator protein. J. Biol. Chem. <u>252</u>, 4108-4117.
- WONG, P.Y.-K., and CHEUNG, W.Y. (1979). *Calmodulin stimulated human platelet phospholipase A2.* Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>90</u>, 473-480.
- WRIGHT, M.S., and COOK, B.J. (1985). Distribution of calmodulin in insects as determined by radioimmuno assay. Comp. Biochem. Physiol., <u>80c</u>, n° 2, pp. 241-244.
- YAMAUCHI, T., and FIJIZAWA, H. (1979). Activation of tryptophan 5-monooxygenase by Calcium-dependent regulator protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>90</u>, 28-35.

YAZAWA, M., SAKUMA, M., and YAGI, K. (1980).
 Calmodulins from muscles of marine invertebrates, Scallop, and Sea Anemone.
 Comparison with Calmodulins from Rabbit Sketetal muscle and Pig brain.
 J. Biochem. <u>87</u>, 1313-1320.

- YINGST, D.R. (1988). Modulation of the Na, K-ATPase by Ca and intracellular proteins. Ann. Rev. Physiol., <u>50</u> : 291-303.