

TU

DESS 1984 9A

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I -

UER de MATHEMATIQUES

DESS D'INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE

Synthèse bibliographique

REGULATION DES PHENOMENES DE TRANSPORT DU Ca (++) DANS LES
MEMBRANES PLASMATIQUES ET INTRACELLULAIRES PAR LES PROCESSUS
DE PHOSPHORYLATION DES PROTEINES.

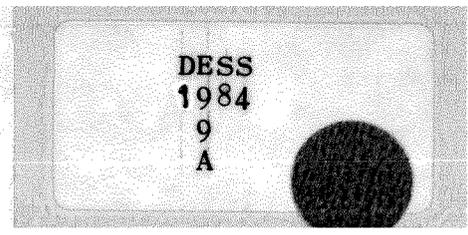


MILIER MARIE-PASCALE 1983 - 84

DESS
1984
9
A

MILIER Marie. Pascale

0669



DESS D'INFORMATIQUE DOCUMENTAIRE

Synthèse bibliographique

MILIER MARIE-PASCALE 1984

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement :

Monsieur CROUZOLON (Maître assistant du laboratoire de Physiologie générale et comparée) qui a bien voulu parrainer mon étude et qui m'a conseillée lors de la rédaction de ce sujet,

Madame MORTREUX qui a dactylographié ce rapport.

SOMMAIRE

I) PRESENTATION DU SUJET

II) RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

- 1) Travail préliminaire
- 2) Choix des outils de recherche
- 3) Présentation des équations de recherche
- 4) Déroulements des sessions
- 5) Résultats de l'interrogation des Bases de données
- 6) Accès aux documents primaires
- 7) Conclusion

III) SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

A) Phosphorylation des proteines intervenant dans le transport du Ca (++) au niveau des membranes plasmiques et intracellulaires du coeur.

1) Au niveau du réticulum sarcoplasmique

1.1 Fonction du réticulum sarcoplasmique

1.2 Flux d'entrée du Ca (++) au niveau du réticulum sarcoplasmique

1.2.1 La pompe à Ca (++) du réticulum sarcoplasmique cardiaque

1.2.11 Structure de la pompe calcique

1.2.12 La prise de Ca (++) et l'hydrolyse de l'ATP

1.2.13 Mécanisme de l'hydrolyse de l'ATP

1.2.2 Régulation de la pompe à Ca (++) par le système AMPc - phospholambane

1.2.21 Phosphorylation du phospholambane

1.2.22 Caractéristiques structurales du phospholambane

1.2.23 Mécanisme d'action du phospholambane

1.2.3 Régulation de la pompe à Ca (++) par le système calmoduline - phospholambane

1.2.4 Régulation de la pompe à Ca (++) par le biais d'une protéine Kinase dépendante du Ca (++) stimulée par les lipides.

1.3 Flux de sortie du Ca (++) au niveau du réticulum sarcoplasmique

2) Au niveau du sarcolemme

2.1 Flux d'entrée du Ca (++) au niveau du sarcolemme

2.2 Flux de sortie du Ca (++) au niveau du sarcolemme

2.3 Régulation de l'échangeur Na (+)/Ca (++)

3) Pertinence physiologique de tels systèmes

B) Phosphorylation des protéines intervenant dans le transport du Ca (++) au niveau du muscle squelettique.

1) Phosphorylation de la protéine de PM = 100 000 D du réticulum sarcoplasmique

2) Phosphorylation de la protéine de PM = 60 000 D du réticulum sarcoplasmique

3) Mécanisme de la stimulation de l'ATPase Ca (++) dépendante

C) Phosphorylation des protéines intervenant dans le transport du Ca (++) au niveau des cellules sanguines.

1) Dans les plaquettes du sang humain

2) Dans les lymphocytes du sang humain

3) Dans les erythrocytes

Conclusion

IV) BIBLIOGRAPHIE

I) PRESENTATION DU SUJET

Cette note de synthèse a été proposée par Monsieur Crouzoulon du laboratoire de Physiologie générale et comparée. Ce laboratoire travaille sur la régulation des processus de transport membranaire par phosphorylation et déphosphorylation des protéines.

Le transport de plusieurs types de substances intéressent le laboratoire :

- parmi les substances inorganiques, essentiellement le Ca^{++} et accessoirement le Na^{+} , le K^{+} , le Phi ,
- parmi les substances organiques, les sucres et accessoirement les acides aminés.

La recherche bibliographique a donc été faite sans spécification des substances concernées par le transport. De plus, il a été décidé que la recherche porterait sur les articles publiés depuis 1980.

Puis étant donné le résultat de l'interrogation des bases de données, il a été convenu que le sujet de la note de synthèse se limiterait à la régulation du transport du Ca^{++} par phosphorylation et déphosphorylation, ceci aussi bien au niveau des membranes intracellulaires que plasmatiques.

II) RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Travail préliminaire.

Mon premier travail a consisté à consulter des ouvrages traitant de la phosphorylation des protéines afin de mieux cerner le sujet proposé et à déterminer les mots clés permettant une recherche bibliographique intéressante.

2) Choix des outils de recherche.

La notion essentielle est bien sûr celle de phosphorylation. La recherche dans les bulletins signalétiques du C.N.R.S. et dans l'index permuté semi annuel des Biological Abstracts par ce mot clé indique un grand nombre de références.

L'examen de celles-ci montre que beaucoup sont non pertinentes car traitant de la phosphorylation oxydative ou de la phosphorylation des sucres. Or, les références recherchées sont celles traitant de la phosphorylation des protéines.

De plus, ce concept de phosphorylation des protéines doit être couplé avec celui de transport membranaire. Ce même transport membranaire concernant les ions, le phosphate, les sucres...

La recherche manuelle s'avère donc quasiment impossible. La recherche informatisée sera donc le moyen choisi pour cette recherche bibliographique car elle permet la combinaison des mots clés.

Trois bases de données seront choisies pour cette recherche bibliographique :

- Medline,
- Pascal,
- Biosis.

Ces trois bases de données couvrant le domaine de la Biochimie, domaine concerné par le sujet de cette note de synthèse.

CARACTERISTIQUES DE CES TROIS BASES DE DONNEES :

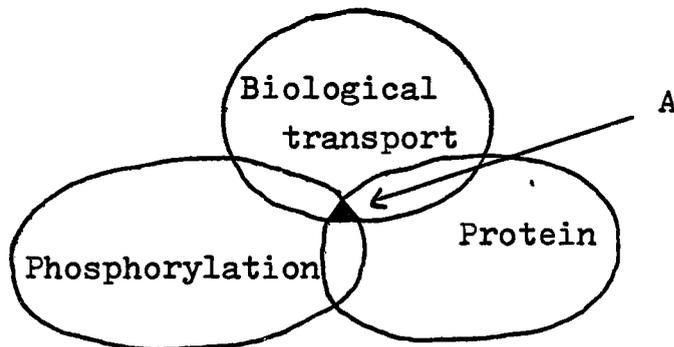
	MEDLINE	PASCAL	BIOSIS
PRODUCTEURS	N.L.M. (National Library of Medicine)	C.N.R.S.	Bioscience Information
SERVEURS UTILISES	N.L.M. (Washington)	Telesystèmes (La Valbonne)	E.S.A. (Agence spatiale européenne) (Italie)
PRODUCTIONS	Index Medicus	Bulletins Signalétiques	Biological Abstracts
DOMAINES COUVERTS	Medecine Clinique et expérimentale - Biologie et Biochimie	Pluridisciplinaire	Bactériologie Botanique Agriculture Biologie Moléculaire Biochimie Génétique
NOMBRE DE PERIODIQUES DEPOUILLES	4 000	12 500	8 000
RESEAU DE TELETRANSMISSION	Telenet Tymenet	Transpac	Telenet Tymenet
AIDE A LA RECHERCHE	Thesaurus "Medical subject Headings"	Lexique	Biosis search guide

3) Présentation des équations de recherche.

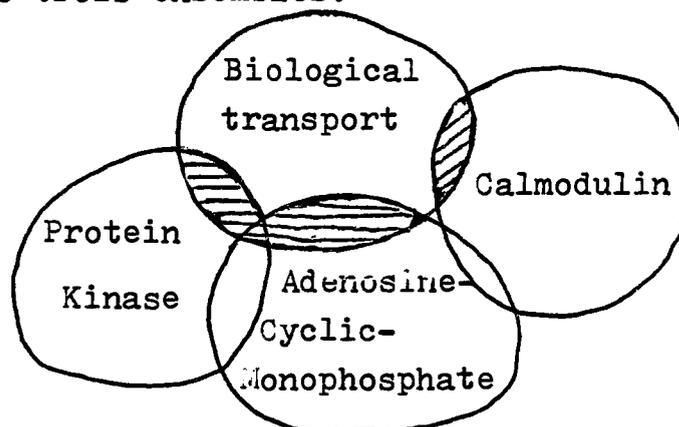
- Equation de recherche pour l'interrogation de Medline :

Les descripteurs phosphorylation et protéin sont présents dans le thésaurus. En ce qui concerne la notion de transport, le descripteur biologique transport présent dans le thésaurus me semble tout à fait adéquat.

De plus, il paraît nécessaire de préciser la notion de phosphorylation des protéines par des termes plus spécifiques. L'étude préliminaire du sujet m'a permis de penser à des termes tels que adenosine-cyclic-monophosphate, protein Kinase et calmodulin présents eux aussi dans le thésaurus. Ces trois termes peuvent être eux aussi combinés avec la notion de biological transport. On aura donc deux parties dans la recherche bien mises en évidence par le biais des diagrammes de Venn.



Les documents recherchés correspondent à l'intersection (A) de ces trois ensembles.



Les références recherchées dans ce deuxième cas correspondent à l'union des trois intersections avec l'ensemble Biologique transport.

L'équation globale de recherche est donc la suivante :

- (1) : Biological transport
- (2) : Phosphorylation and protein
- (3) : 1 and 2
- (4) : (Protein Kinase and 1) or (Adenosine cyclic monophosphate and 1) or (Calmodulin and 1)
- (5) : 3 or 4

- Equation de recherche pour l'interrogation de Pascal :

De même que pour l'interrogation de Medline, les notions de phosphorylation et de protein sont elles mêmes des descripteurs du lexique. Ces deux descripteurs combinés par l'opérateur booleen et traduiront la notion de phosphorylation de proteine. Le logiciel Questel permet l'emploi de la troncature. Le ? remplaçant n'importe quelle lettre. L'entrée du descripteur protein ?? permettra donc de prendre en compte le pluriel du terme, qu'il s'agisse du terme français ou anglais. La notion de phosphorylation de proteines doit être ensuite couplée avec celle de transport.

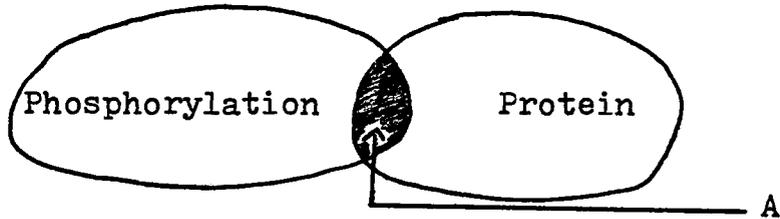
Un essai, en stage à l'URFIST, m'a permis de voir que ces deux descripteurs couplés avec le descripteur transport biologique ne donnait que trois références. Le descripteur transport biologique apparaît donc trop restrictif. Il semble donc nécessaire de considérer le terme transport et d'autres termes synonymes tels que perméabilité, transfert, etc...

La phosphorylation protéique ne pourra être sur Pascal précisée par d'autres termes, tels que protein Kinase... car ces termes sont absents du lexique et ne peuvent être utilisés comme unitermes carnoms composés.

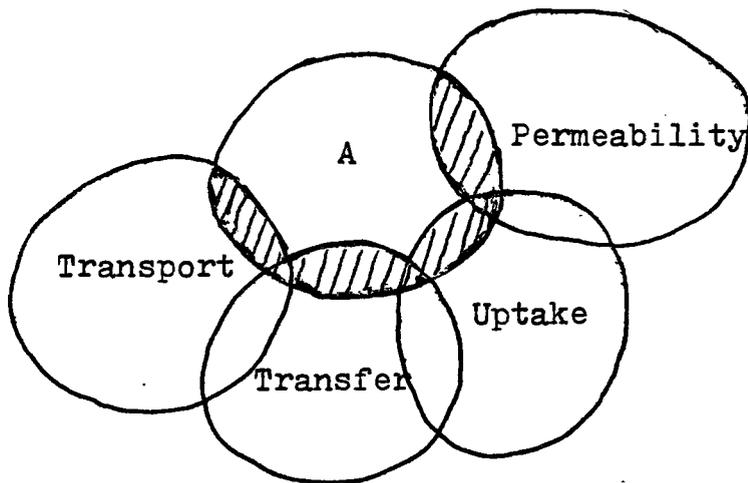
La recherche sur Pascal peut se faire en langue anglaise ou française. J'ai choisi d'interroger en langue anglaise pour pouvoir ainsi prendre en compte les unitermes du titre non

traduits en français.

Sous forme de diagramme de Venn, on aura donc :



A : intersection des ensembles phosphorylation et protein.



L'union des quatre intersections ($A \cap \text{transport}$) ; ($A \cap \text{transfer}$) ; ($A \cap \text{uptake}$) ; ($A \cap \text{permeability}$) donnera les références recherchées.

Ce qui se traduit par l'équation suivante :

- (1) : Phosphorylation et Protein??
- (2) : 1 et Transport
- (3) : 1 et Permeability
- (4) : 1 et Uptake
- (5) : 1 et Transfer
- (6) : 2 ou 3 ou 4 ou 5

La précision uniterme ou descripteur ne sera pas apportée dans l'équation de recherche. Ainsi, les mots clés utilisés, qu'ils s'agissent de descripteurs ou d'unitermes, seront recher-

chés par le logiciel dans le lexique de Base implicite ou Basic Index (/BI) regroupant plusieurs sous lexiques.

- Equation de recherche pour l'interrogation de Biosis :

Le logiciel permet l'emploi de la troncature et de l'opérateur d'adjacence. Les notions de phosphorylation et protein sont des descripteurs du guide. En ce qui concerne la notion de transport membranaire, ma première idée fut d'utiliser le concept code se rapportant aux phénomènes membranaires.

Ce concept code rend compte du transport mais aussi d'autres types de phénomènes. Donc, en fait, ne peut être utilisé car il occasionnerait trop de bruit. Il est préférable d'utiliser les mots clés, transport, transfer, transit ou permeability.

Les résultats obtenus antérieurement sur Medline m'ont permis de voir que pour préciser la notion de phosphorylation, il était nécessaire de combiner Protein Kinase et AMPc ainsi que Calmodulin et Protein Kinase ceci pour obtenir moins de bruit.

La notion d'adenylate-cyclase-monophosphate doit être introduite par l'abréviation cAMP . Quant au terme de protein Kinase, il doit être introduit en deux mots reliés par l'opérateur d'adjacence (w).

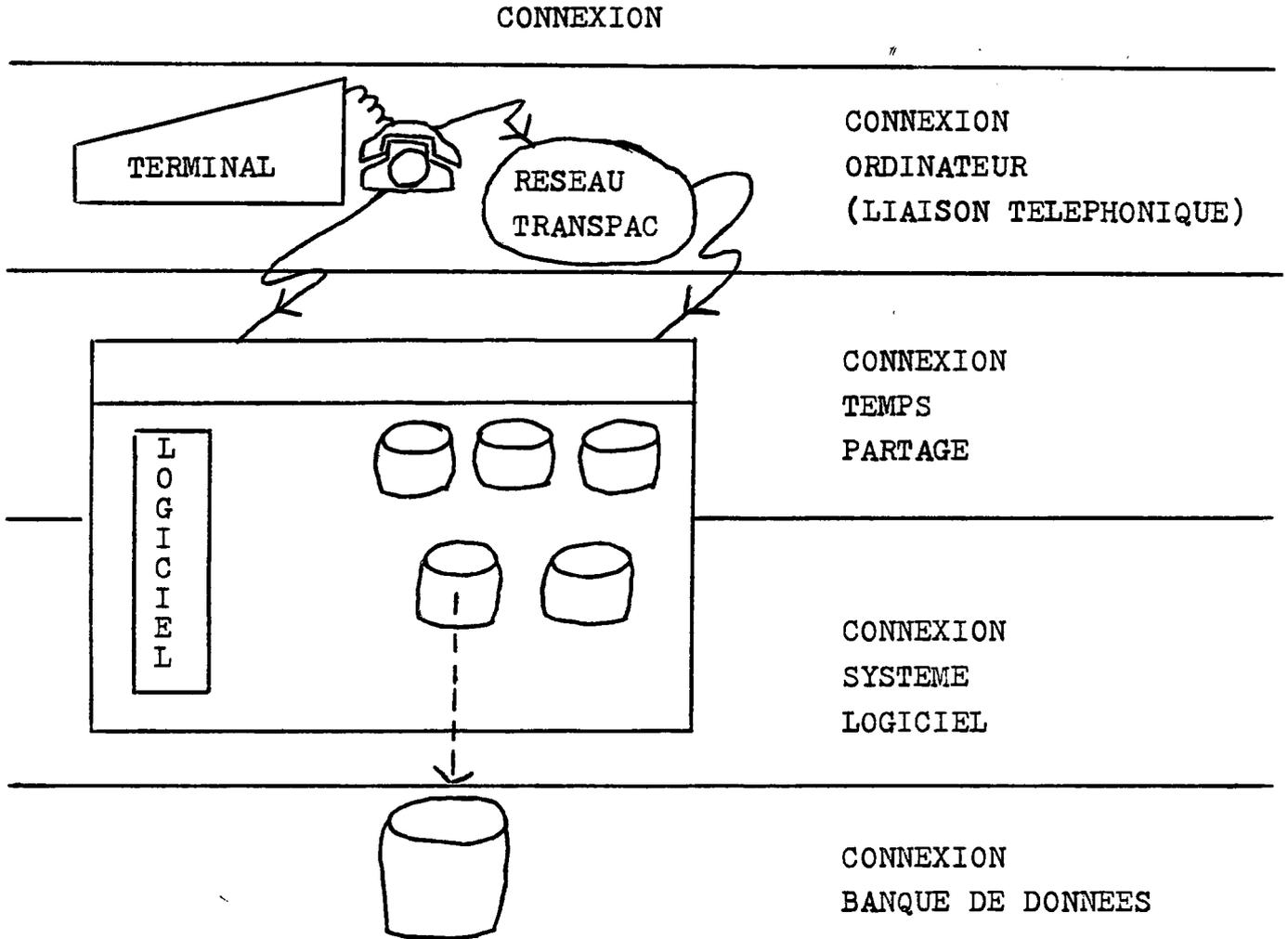
L'équation globale sera alors la suivante :

- (1) : Phosphorylation
- (2) : Protein?
- (3) : Transport ? or transfer or transit or permeability?
- (4) : 1 * 2 * 3
- (5) : c AMP
- (6) : Protein (w) Kinase
- (7) : Calmodulin

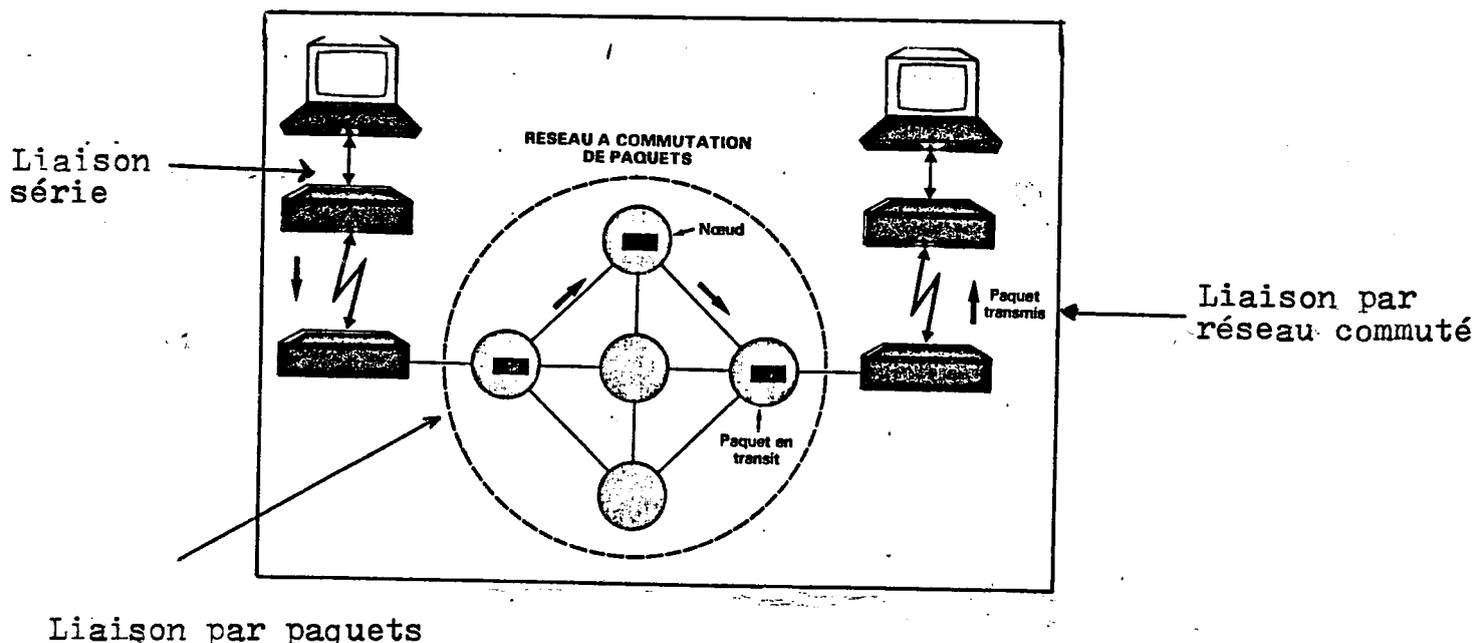
(8) : (3 * 5 * 6) + (3 * 7 * 6)

(9) : 4 + 8

4) Déroulements des sessions.



Grâce au réseau Transpac et pour le prix d'une simple communication téléphonique, j'ai pu entrer en liaison avec le serveur Télésystèmes. L'accès au NLM pour Medline et à l'ASE pour Biosis se fait par contre par les réseaux Tymenet ou Telenet. Ces réseaux sont des réseaux de transmission par paquets. (Voir le schéma suivant).



Voici les différentes opérations effectuées lors de l'interrogation :

- a) Numéro de téléphone Transpac
onde porteuse
connexion terminal - réseau téléphonique
- b) Login
- c) Mot de passe
Message de bienvenue
Connexion terminal - serveur
en temps partagé
- d) Sessions
Pour Medline :
(1) Biological Transport
7298

(2) Phosphorylation and Protein

- (3) 1 and 2 (Pour s'assurer que les références
 conviennent, affichage de quelques
 titres).
40
- (4) (Protein Kinase and 1) or (Adenosine-cyclic-mono
 phosphate and 1) or (calmodulin and 1)
267
- (5) 4 and 83 (yr)
119 (Etant donné le trop grand nombre de
 références obtenues en 4, sélection
 des références que sur 83).
- (6) 5 and not 3 (On élimine les références communes
 aux étapes 3 et 5).
108
- (7) 3/6 (Commande en différé des références
 obtenues par les étapes 3 et 6).

Pour Pascal :

.. da 1980, 1984. (Le fichier Pascal couvrant les ré-
 férences de 1977 à 1984, nécessité
 de limiter le fichier dans le temps).

- (1) Phosphorylation and protein??
1772
- (2) 1 and Transport
64
- (3) 1 and Transfer
8
- (4) 2 or 3
70
- (5) 1 and uptake
8

(6) 5 or 6

75

(7) 1 and permeability

6

(8) 7 or 8

78

(Pour s'assurer que les références conviennent, affichage de quelques titres, puis commande en différé des références obtenues au terme de l'étape 8).

Pour Biosis :

L/69-77

(Sélection des références allant de 1980 à nos jours par l'intermédiaire des numéros de volumes).

- s phosphorylation

(I) 2980

- s protein?

(2) 51_822

- f transport? or transfer? or transit or permeability?

(3) 9323 transport?

(4) 5530 transfer

(5) 304 transit

(6) 3134 Permeability?

(7) 17928 3 + 4 + 5 + 6

- c 1 * 2 * ?

(8) 66

- s CAMP

(9) 37

- s protein (w) Kinase

(I0)1407

- s calmodulin

(II)870

- c (9 * 10 * 7) + (11 * 10 * 7)

(I2)8

- c 8 + 12

(I3)71

(Affichage de quelques titres, commande en différé des références obtenues au terme de cette étape).

Remarque : les chiffres soulignés en pointillé correspondent au nombre de références obtenues au cours de chaque étape.

e) Deconnexion

Deconnexion base de données - terminal

Temps d'utilisation du fichier

Nombre de références commandées en différé

Déconnexion - système

5) Résultats de l'interrogation des bases de données.

J'ai distingué là encore trois parties suivant qu'il s'agissait de l'interrogation de Medline, Pascal ou Biosis.

Résultats de l'interrogation de Medline.

Cette interrogation m'a donné 50 % de pertinence pour l'équation de recherche :

Phosphorylation and protein and Biological transport

Je peux donc considérer que la stratégie de recherche était bonne.

Par contre, pour l'équation :
 (Protein Kinase and Biological transport) or
 (Calmodulin and Biological transport) or
 (AMPC and Biological transport)

J'ai alors obtenu que 11 % de pertinence. Ceci s'explique par le bruit apporté par les termes AMPC et calmoduline.

L'équation écrite ainsi :
 (Protein Kinase and CAMP and Biological transport) or
 (Protein Kinase and calmodulin and Biological transport)

sans doute, aurait apporté beaucoup moins de bruit. Ce résultat montre, de plus, que très peu de textes traitant de la phosphorylation des protéines ne sont pas indexés par le descripteur phosphorylation. Donc par ce biais, j'ai pu jugé de la bonne qualité de l'indexation.

Résultats de l'interrogation de Pascal.

Le taux de pertinence pour cette interrogation est alors de 60 % dont 5 % des références sont communes à Medline. Je me permettrais de souligner qu'il est regrettable que les documents ne soient pas indexés sous la notion de transport biologique, présente dans le lexique ; mais par les termes de transport, perméabilité, transfert. L'utilisateur de la base de données se doit donc de penser à tous les termes synonymes de transport, ne sachant pas comment l'indexation a été faite.

Résultats de l'interrogation de Biosis.

Le taux de pertinence calculé est alors de 40 % dont 31 % des références pertinentes sont communes à Pascal et 3 % sont communes à Medline.

Pour cette interrogation, j'ai constaté de nouveau que seulement 5 textes sont indexés par les termes spécifiques de

(protein Kinase et AMPc) ou (protein Kinase et Calmodulin) et non par le terme de phosphorylation.

En conclusion, il ressort de ces interrogations que l'utilisation de plusieurs bases de données a permis d'accroître le nombre de documents pertinents et, par conséquent, de diminuer le silence.

Nous avons pu constater, de plus, qu'il y a peu de recoupement de références (5 %) entre les bases de données Pascal et Medline. Par contre, il y a plus de recoupement entre Biosis et Pascal (30 %). J'en conclus donc que ces deux dernières bases couvrent d'avantage les périodiques d'origine européenne alors que Medline couvre d'avantage les périodiques d'origine américaine.

D'après la présentation faite par l'Association Nationale de la Recherche Technologique (1980), l'origine des références des documents présentés dans Pascal est surtout européenne (62 %) et d'Amérique du Nord (25 %). Biosis, par contre, traite les périodiques provenant d'Europe (38 %), d'Amérique du Nord (26 %), d'Asie et d'Océanie (15 %), du Moyen-Orient (12 %). Quant à Medline, elle recueille plus de 100 périodiques français, soit à peu près 2,5 % du total des périodiques. 69 % des références étant en anglais.

Etant donné qu'aucune référence de travaux traitant de la phosphorylation des protéines intervenant dans le transport des substances organiques ait été trouvée ; et vu le grand nombre de références obtenues sur le transport de substances inorganiques, il a été décidé en accord avec le chercheur que seule la phosphorylation des protéines régulant le transport du Ca (++) serait traitée.

6) Accès aux documents primaires.

Les banques de données ont permis une recherche bibliographique rapide par opposition à une recherche manuelle. Mais ensuite, l'obtention des documents primaires, pour en effectuer la synthèse, s'est révélée être une étape longue.

La recherche s'est faite grâce au catalogue des périodiques du Rhône indiquant pour chacun d'eux sa localisation et l'état de sa collection. Beaucoup des périodiques recherchés se trouvaient à la Bibliothèque Universitaire de la Doua ou à la Bibliothèque Universitaire de Rockefeller. J'ai pourtant dû me procurer quelques documents dans les différents laboratoires de la Faculté des sciences ou à l'INSA.

Le développement de techniques telle que la télécopie devrait permettre de pallier la difficulté que constitue l'accès aux documents primaires.

7) Conclusion.

J'ai pu prendre conscience au cours de ces diverses sessions qu'une bonne interrogation nécessite la connaissance parfaite des différents champs de la base et donc des lexiques se rapportant à chacun des champs. Les commandes pour l'interrogation sont elles aussi différentes suivant le serveur utilisé.

Un documentaliste ne pourra donc connaître parfaitement que quelques bases de données et se spécialisera dans l'interrogation de ces bases. De plus, une certaine compétence du domaine traité par la base sera un atout non négligeable pour une bonne interrogation de la base. J'ai pu voir qu'une fois l'équation de recherche établie, il faut pouvoir la moduler en fonction du nombre de références. Cela nécessite donc un certain apprentissage de l'interrogation.

Tout au long de ce travail, le dialogue avec le chercheur s'est révélé être nécessaire. Il m'a permis de définir les mots clés les plus significatifs, de discuter les résultats obtenus et de sélectionner les références les plus pertinentes en fonction de ses préoccupations.

Il reste que les bases de données sont un moyen d'accès rapide aux références souhaitées, et, en cela, constituent une aide précieuse aux documentalistes et donc aux chercheurs.

III) SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Il est bien connu que la concentration en ions du milieu intracellulaire est différente de celle du milieu environnant. Ainsi, l'on sait que la concentration cellulaire est forte en ions K^+ alors qu'elle est faible en ions Na^+ . De même, nous savons que le réticulum endoplasmique des cellules musculaires accumule les ions Ca^{++} .

Les ions intracellulaires pour une grande majorité d'entre eux sont fixés par interaction de charges à des protéines à l'intérieur de la cellule. Ceci expliquerait donc partiellement le gradient de concentration des ions. Un transport actif utilisant de l'ATPase permet le transport de ces ions contre les gradients de concentrations. Les enzymes responsables de ce transport actif au niveau de la membrane plasmique sont la $Na^+ - K^+ - ATPase$ et la $Ca^{++} ATPase$. De plus, comme nous le verrons, le transport actif du Ca^{++} est contrôlé par la phosphorylation de certaines protéines autre que l'ATPase.

D'autre part, la phosphorylation de protéines membranaires particulières ouvrirait ou fermerait les pores à certains ions diminuant ou augmentant la perméabilité passive de la membrane (Weller ; 1979).

La phosphorylation protéique intervenant dans le transport du Ca^{++} sera envisagée successivement dans les tissus suivants : coeur, muscle squelettique, cellules sanguines. Pour chacun de ces tissus, on précisera la membrane concernée par le transport.

A) Phosphorylation des protéines intervenant dans le transport du Ca^{++} au niveau des membranes plasmiques et intracellulaires du coeur.

Le Ca^{++} joue un rôle majeur dans le couplage excitation

contraction du myocarde.

A l'état de repos de la cellule, les ions Ca (++) sont répartis dans trois compartiments :

- le cytosol est caractérisé par une faible concentration en Ca (++) : (0,1 μ M)
- l'espace extracellulaire contient approximativement 2 mM de Ca (++)
- le réticulum endoplasmique est capable d'accumuler de 10 à 20 mM de Ca (++)

La concentration cardiaque est déclenchée par une augmentation de 100 fois de la concentration cytosolique en Ca (++) qui passe de 0,1 à 10 μ M. Ce Ca (++) provenant du réticulum endoplasmique et des espaces extracellulaires. Le retour aux concentrations initiales se fait par l'échangeur Na(+)/Ca(++) au niveau du sarcolemme ou par le transport du Ca (++) ,ATP dépendant, au niveau du sarcolemme et du réticulum sarcoplasmique. (Haiech, Demaille ; 1983).

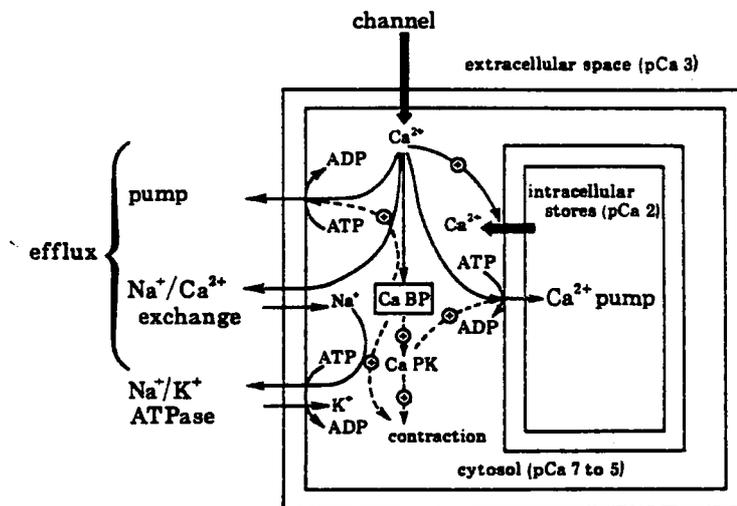


FIGURE 1. A scheme of the major cell compartments. Heavy arrows indicate Ca^{2+} channels in sarcolemmal and reticular membranes. CaBP, calcium-binding protein; CaPK, Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinases; pCa = $-\log_{10}[\text{free Ca}^{2+}]$; + stands for activation. Solid arrows indicate ion binding or fluxes. (From Demaille & Pechère (1983), with permission.)

La contraction est modifiée par l'adrénaline dont les effets sont reproduits par l'AMPc. Or, cette dernière agit en activant une protéine Kinase. On peut donc supposer que l'adré-

naline agit en modifiant les mouvements de Ca (++) qui règlent la force et la fréquence cardiaque. Puisqu'elle agit par l'AMPc et donc par phosphorylation de protéines, on peut penser que les phosphorylations de protéines sont impliquées dans les transports calciques.

1) Au niveau du réticulum sarcoplasmique

1.1 Fonction du réticulum sarcoplasmique

Dans le cycle contraction-relaxation du myocarde, le réticulum sarcoplasmique contrôle le flux calcique à travers cette membrane. La libération de Ca (++) du réticulum sarcoplasmique induit la contraction tandis que la relaxation est produite par la réaccumulation du calcium par le réticulum sarcoplasmique.

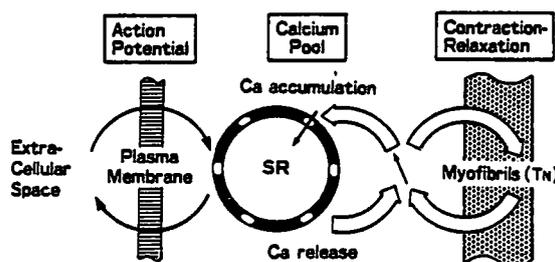


Fig. 2. Calcium movements within cardiac cells. (Modified from Fabiato & Fabiato (1979))

TN: troponin

SR: sarcoplasmic reticulum

Une protéine réceptrice du calcium, la troponine, présente dans les filaments de myofibrilles, fixe le Ca (++) libéré du réticulum sarcoplasmique, ce qui induit la contraction myofibrillaire.

La suppression du Ca (++) de la troponine effectuée lors de la prise de Ca (++) par le réticulum sarcoplasmique est à l'origine de la relaxation myofibrillaire (Tada, Yamada et coll ; 1982).

1.2 Flux d'entrée du Ca (++) au niveau du réticulum sarcoplasmique cardiaque

1.2.1 La pompe à Ca (++) du réticulum sarcoplasmique cardiaque

1.2.1.1 Structure de la pompe calcique

L'enzyme ATPase du réticulum sarcoplasmique est considérée servir de transducteur d'énergie aussi bien que de transporteur de Ca (++) . C'est un polypeptide amphipathique de PM = 100 000 dont les régions hydrophobes sont en contact avec la membrane lipidique et les parties hydrophiles se trouvent sur la face externe de la membrane.

Deux fragments de PM = 52 000 - 60 000 et 45 000 - 55 000 ont été obtenus par traitement à la trypsine des vésicules du réticulum sarcoplasmique.

Table 1. Molecular weights of sarcoplasmic reticulum ATPase and its tryptic subfragments.

ATPase	Primary degradation		Secondary degradation		Reference
	Fragment I	Fragment II	Fragment Ia	Fragment Ib	
115 000	60 000	55 000	33 000	24 000	Thorley-Lawson and Green (25, 26)
102 000	55 000	45 000	30 000	20 000	Stewart, MacLennan, and co-workers (27-29)
100 000	60 000	49 000	32 000	21 000	Yamamoto and Tonomura (30)
106 000	57 000	46 000			Inesi and Scales (31)
100 000	52 000	49 000			Louis et al. (32, 33)
120 000*	65 000*	56 000*			Yu et al. (34)
115 000 or 119 000†	56 000†	59 000†			Rizzolo et al. (35) and le Maire et al. (36)

Values were determined by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels in all reports except those by Rizzolo et al. and le Maire et al.

* ATPase protein labeled with diazotized diiodosulfanilic acid was subjected to subfragmentation.

† Determined by sedimentation equilibrium measurements in SDS (35) or in deoxycholate (36). Tada, Yamamoto ; (1978)

Le plus gros fragment (I) contient le site de phosphorylation et probablement les sites de liaison du Ca (++) . Le plus petit fragment (II) est hydrophobe et est plus intramembraire. Le fragment I par contre représente la portion hydrophile de l'ATPase et est exposé à la surface externe de la membrane. Une autre protéolyse du fragment I donne deux sous

fragments de 30 000 - 33 000 Dalton (fragment Ia) et 20 000 - 24 000 D (fragment Ib). Le fragment Ia contient le site de phosphorylation et le fragment Ib contient les sites de liaison du Ca (++) . L'utilisation d'anticorps indique que le fragment Ia est à localisation externe et que le fragment Ib est seulement partiellement externe. Il est intéressant de noter que la localisation plus ou moins externe du fragment Ib varie durant le transport du Ca (++) par l'ATPase (Tada, Yamada et coll ; 1982).

1.2.12 Prise de Ca (++) et hydrolyse de l'ATP par l'ATPase

Les vésicules intactes de réticulum sarcoplasmique cardiaque accumulent le Ca (++) en présence de Mg (++) et ATPase réduisant ainsi la concentration en Ca (++) du milieu réactionnel. Dans ces conditions, le Ca (++) est transporté à travers la membrane et stocké dans la lumière du réticulum sarcoplasmique.

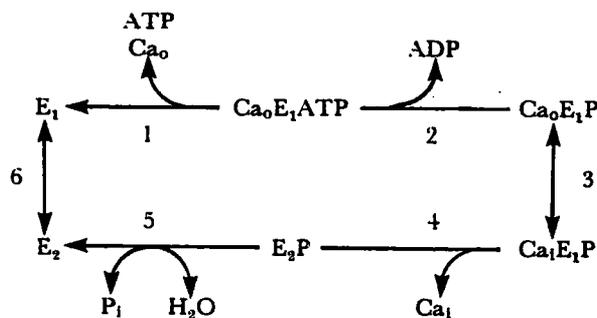
A faible concentration en Ca (++) ionisé (30 à 50 μ M) et en l'absence d'anions précipitant le Ca (++) (oxalate ou phosphate) les vésicules du réticulum sarcoplasmique accumulent rapidement jusqu'à 70 nmole de Ca (++)/mg de protéine. Quand l'oxalate est inclus dans le milieu réactionnel, les vésicules du réticulum sarcoplasmique cardiaque accumulent de 6 à 10 μ Mole de Ca (++)/mg de protéine. En effet, les membranes du réticulum sarcoplasmique sont perméables à l'oxalate. Celui-ci forme des cristaux avec une partie du Ca (++) intracellulaire. On n'a plus alors l'effet inhibiteur du Ca (++) intracellulaire libre sur le flux d'entrée du Ca (++) dans les vésicules et la concentration globale en Ca (++) intracellulaire est alors supérieure en présence d'oxalate. Dans les vésicules intactes, un étroit couplage existe entre le Ca (++) et l'ATP, 2 moles de Ca (++) sont transportées par mole d'ATP hydrolysée.

La prise de Ca (++) et l'hydrolyse de l'ATPase dépendante du Ca (++) sont activées par de faible concentration en Ca (++) du milieu. Ces 2 activités augmentent pour des concentrations en Ca (++) croissantes. Ces activités sont maximales pour des concentrations en Ca (++) de 3 à 10 μ M. Lors de l'hydrolyse de l'ATP Ca (++) dépendante par le réticulum sarcoplasmique cardiaque, le phosphate terminal de l'ATP est incorporé à l'ATPase. La phosphoprotéine formée est un acyl-phosphoprotéine qui est labile dans l'hydroxylamine. Une telle phosphorylation a lieu sur le groupe carboxyl du résidu acide aspartique de l'ATPase. Un grand nombre de travaux indiquent que l'enzyme phosphorylé EP est un intermédiaire de l'hydrolyse de l'ATP. (Tada, Inui ; 1983).

1.2.13 Mécanisme de l'hydrolyse de l'ATP

L'ATPase du réticulum sarcoplasmique cardiaque subit des transitions conformationnelles successives durant le transport du Ca (++) et l'hydrolyse de l'ATP.

Les études les plus récentes ont conduit à proposer le modèle suivant :



Ca_o = Ca (++) externe

Ca_i = Ca (++) interne

L'ATPase est considérée avoir deux

conformations majeures : l'état E1 qui présente une forte affinité pour le Ca (++) (E1 et Elp) et l'état E2 qui présente une faible affinité pour le Ca (++) (E2 et E2p). Dans des conditions physiologiques, 2 moles de Ca (++) et une mole de Mg-ATP réagissent avec une mole d'ATPase (E1) sur la face externe des membranes pour former un complexe michaelien (étape 1). L'ADP est libéré sur la face externe de la membrane. La formation de CaoElp est suivie par la translocation du Ca (++) à l'intérieur de la membrane du réticulum sarcoplasmique formant CaiElp (étape 3). Le Ca (++) est ensuite libéré dans les vésicules quand Elp est converti en E2p (étape 4). Elp peut donner son groupe phosphate à de l'ADP ajouté pour former l'ATP. Tandis que E2p ne peut pas réagir avec l'ADP ajouté. La conversion du phosphoenzyme de l'état Elp à l'état E2p semble être couplée à une diminution de l'affinité pour le Ca (++) . E2p se décompose en Pi et E2 (étape 5) et E2 est transformée en E1 (étape 6). L'ATPase a donc terminé un cycle catalytique.

La transition de E2 en E1 (étape 6) induite par l'addition de Ca (++) détermine le taux de phosphorylation de l'enzyme.

La décomposition du phosphoenzyme est accélérée par Mg (++) ou K (+) et inhibée par de fortes concentrations en Ca (++) . Les concentrations en Ca (++) supérieures à 1mM inhibent la conversion de Elp en E2p. Mg (++) accélère la conversion de Elp en E2p et l'hydrolyse de E2p. K (+) accélère l'hydrolyse de E2p. De plus, l'ATP en grande quantité accélère l'hydrolyse de E2p et la transition de E2 en E1. Donc, dans ces conditions physiologiques, où de fortes concentrations en Mg (++) , ATP et K (+) sont présentes, l'hydrolyse de E2p et la transition de E2 en E1 deviennent plus rapides. Dans ces conditions, la conversion de Elp en E2p (étape 4) détermine le taux de la réaction totale (Tada, Inui ; 1983)(Tada, Yamada et coll ; 1982).

1.2.2. Régulation de la pompe à Ca (++) par le système AMPc - phospholambane

Le réticulum sarcoplasmique cardiaque est capable de former un autre type de phosphoprotéine quand il réagit avec la Protéine Kinase CAMP dépendante. Cette protéine phosphorylable a un PM = 22 000 D et constitue un des principaux sites d'action de la Protéine Kinase CAMP dépendante.

1.2.21 Phosphorylation du phospholambane

Quand les membranes du réticulum sarcoplasmique cardiaque sont incubées avec l'AMPc en l'absence et présence de Protéine Kinase activée par l'AMPc exogène, une phosphoprotéine est formée.

La formation de cette phosphoprotéine est indépendante du Ca (++) jusqu'à 0,1 mM mais est dépendante de CAMP entre 0,1 et 10 μ M. La moitié de l'activation maximale est obtenue pour une concentration voisine de 0,2 μ M. Le phosphate terminal de l'ATP est incorporé dans une protéine de 22 000 Dalton après que les vésicules du réticulum sarcoplasmique cardiaque soient incubées avec la Protéine Kinase CAMP dépendante.

La Protéine Kinase dépendante de l'AMPc associée aux membranes du réticulum sarcoplasmique a été solubilisée dans le triton X100 puis purifiée par chromatographie sur DEAE cellulose. Elle a été caractérisée comme l'enzyme type II identique à la Protéine Kinase type II de cytosol. Cette Protéine Kinase type II dépendante de l'AMPc a comme substrat une protéine de 22 000 D (Kranias; 1982). La phosphoprotéine formée exhibe les caractéristiques de stabilité d'un phosphoester dans lequel le phosphate est fixé à un résidu sérine.

Tada et coll ont comparé l'ATPase à cette phosphoprotéine. (Tada, Ohmori, et coll ; 1978).

Table 2. Comparison of the two phosphoproteins formed in the cardiac sarcoplasmic reticulum.

Parameter	Phospholamban	ATPase
1) Molecular Weight	22 000	100 000
2) P-amino acid	Serine	Aspartic acid
3) Nature of phosphoprotein	Phosphoester (stable in hot acid and in hydroxylamine)	Acyl phosphate (labile in hydroxylamine)
4) Amount of phosphorylation	0.7-1.3 nmoles/mg	0.6-1.3 nmoles/mg
5) Dependency of phosphorylation on Ca^{2+}	Independent of Ca^{2+} *	Dependent on Ca^{2+}
6) Sensitivity to trypsin	Labile to trypsin	Relatively resistant to trypsin
7) Physiological function	Substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase Modulator of Ca^{2+} -transport ATPase	Transports Ca^{2+} , which is directly coupled to the contraction-relaxation cycle

*In the presence of calmodulin, the phosphorylation of phospholamban exhibits a marked dependency on Ca^{2+} (See text for explanation).

Tada, Ohmori et coll ; (1978)

Un grand nombre de groupes confirment ces découvertes selon lesquelles la protéine de 20 000 à 24 000 D est le site majeur de phosphorylation de la Protéine Kinase CAMP dépendante.

3) Molecular weights of proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac sarcoplasmic reticulum.

Investigators	Year	Animals	Phospholamban	Other phosphoprotein
			Molecular weight (1000 daltons)	Molecular weight (1000 daltons)
LaRaia & Morkin (45)	1974	Rabbit	20K	
Tada et al. (11)	1975	Dog	22K	11K
Kirchberger & Tada (48)	1976	Dog, cat, guinea pig rabbit	22K	11K
Schwartz et al. (49)	1976	Dog	20K	
Wray & Gray (50)	1977	Dog	20K	
Will et al (51)	1978	Pigeon	22K	15K
St. Louis & Sulakhe (52)	1979	Pig	22K	56K 16K
Jones et al. (18)	1979	Dog	20K	7K
Lamers & Stinis (53)	1980	Rat	24K	9K
Bidlack & Shamoo (54)	1980	Dog	22K	6K
Le Peuch et al. (55)	1980	Dog	22K	11K 7K
Tada et al. (56)	1982	Dog	22K	11K

From Tada & Katz, (1982)

Cette protéine de 20 000 à 24 000 D a été appelée phospholambane signifiant "phosphate récepteur".
(Tada, Inui ; 1983) (Tada, Yamada et coll ; 1982).

1.2.22 Caractéristiques structurales du phospholambane

La phosphorylation maximale du phospholambane par la sous-unité catalytique de la Protéine Kinase CAMP dépendante augmente à partir du 4^e jour dans le coeur de poulet embryonnaire. On en déduit donc la présence précoce du phospholambane dans le coeur du poulet en formation (Will ; 1983).

Le phospholambane qui contient 40 à 45 % de résidus hydrophobes est intimement associé à la membrane du réticulum sarcoplasmique et apparaît être une protéine acide. Une portion du phospholambane est exposée à la surface externe des vésicules du réticulum sarcoplasmique. En effet, il peut être phosphorylé par la Protéine Kinase - CAMP exogène tandis que la digestion protéolytique empêche sa phosphorylation. L'impossibilité d'obtenir des iodates de phospholambane reflète la localisation des résidus tyrosine dans la partie interne de la membrane. Le phospholambane fut initialement supposé être un simple peptide qui migre électrophorétiquement comme une protéine de 22 000 D en présence de SDS. L'addition de Triton X 100 aux membranes de réticulum sarcoplasmique phosphorylées provoque l'apparition concomitante d'une phosphoprotéine de 11 000 D et d'une phosphoprotéine de 5 000 D à 7 000 D après électrophorèse en SDS gel de polyacrylamide.

La composition en acides aminés du phospholambane a été étudiée par plusieurs groupes qui utilisent différentes procédures pour séparer le phospholambane des autres protéines.

4 Comparison of amino acid compositions of phospholamban^a

Amino acid	Le Peuch <i>et al.</i> ^c	Collins <i>et al.</i> ^d	Kirchberger & Antonetz ^e	Bidlack <i>et al.</i> ^f
Asp	11.1	8.93	8.2	10
Thr	5.5	4.79	4.5	5.5
Ser	5.5	5.75	9.5	9.5
Glu	11.4	16.7	11.9	12.2
Pro	5.5	2.34	2.3	3.3
Gly	10.6	1.85	11.6	11.7
Ala	11.0	8.55	6.4	8.33
Val	6.5	5.08	4.8	4.44
Met	1.7	5.90	1.5	2.1
Ile	4.9	9.77	5.5	2.2
Leu	9.5	13.3	8.9	6.7
Tyr	2.1	2.29	3.6	2
Phe	3.4	3.68	3.8	10.6
Lys	4.9	2.51	4.4	6.1
His	2.0	<0.1	1.6	3.3
Arg	4.4	8.63	4.3	2.8
Cys	0	ND ^b	0.8	0
Trp	ND	ND	ND	ND

^a Expressed as residues per 100 residues.

^b Not determined.

^c Phospholamban was isolated by two-dimensional gel electrophoresis in the presence of SDS [2].

^d Phospholamban was purified by column chromatography of Sepharose CL-6B and Sephadex LH-60 [6].

^e Phospholamban was isolated by gel electrophoresis in the presence of SDS after removal of proteolipid [17].

^f Phospholamban was purified by gel filtration through Sephadex G-75 [3].

Tada, Inui ; (1983)

Le P.M. minimum du phospholambane est estimé être égal à environ 5 500 D. Le phospholambane de 22 000 D représente probablement un oligomère. Une transition oligomère-monomère est possible.

Le phospholambane représente environ 4 % à 6 % des protéines totales du réticulum sarcoplasmique cardiaque. Une stoechiométrie 1 - 1 entre le phospholambane et l'ATPase est suggérée par les quantités respectives des deux phosphoprotéines formées dans la membrane. Pour le moment, on ne sait pas comment la forme oligomérique du phospholambane est reliée à l'ATPase qui elle aussi fonctionne comme une oligomère.

1.2.23 Mécanisme d'action du phospholambane

Le transport actif du Ca (++) dans les vésicules du réticulum sarcoplasmique cardiaque est augmenté considérablement quand les vésicules sont préalablement phosphorylées par incubation avec une concentration optimale en cAMP et cAMP protein Kinase. Dans ces conditions de phosphorylation du phospholambane, la prise du Ca (++) par les vésicules du réticulum sarcoplasmique cardiaque en présence d'oxalate est plus que doublée.

La stimulation de la prise de Ca (++) est bien corrélée à la phosphorylation du phospholambane dans les vésicules du réticulum sarcoplasmique cardiaque traitées avec la phosphoprotéine phosphatase ou l'inhibiteur de la protéine Kinase. La stimulation observée de la prise de Ca (++) par la phosphorylation du phospholambane est accompagnée d'une augmentation du taux d'hydrolyse de l'ATP, la stoechiométrie entre la prise de Ca (++) et l'hydrolyse de l'ATP est maintenue environ deux heures après que le phospholambane soit phosphorylé.

Donc, l'accélération de la prise de Ca (++) par la phosphorylation du phospholambane est due à une augmentation du turn over de l'ATPase mais pas à une augmentation d'efficacité de la pompe à Ca (++) . (Tada, Yamada et coll ; 1980).

Pour déterminer le mécanisme moléculaire par lequel la phosphorylation régule la pompe à Ca (++) dans le réticulum sarcoplasmique, Kranias et coll avaient examiné l'effet de la Protéine Kinase cAMP dépendante sur les étapes de la réaction catalysée par l'ATPase calcique. Ils ont montré que l'augmentation des niveaux de E_vP n'est pas due à une augmentation du taux de formation de E_vP mais est due à une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le Ca (++) . (Kranias, Mandel et coll ; 1980).

Ceci est donc démenti par Tada, Yamada et coll en 1980. Les altérations observées des propriétés cinétiques peuvent être interprétées par l'accélération des deux étapes clefs de la réaction ATPasique. La phosphorylation du phospholambane accélère deux étapes de la réaction ATPasique, la conversion de E₁p en E₂p (étape 4) durant la décomposition de EP et la conversion de E₂ en E₁ (étape 6) durant la formation de EP. La vitesse de formation de EP est considérablement augmentée par la phosphorylation du phospholambane quand la réaction commence à E₂. Au contraire, le taux de formation de EP n'est pas affecté quand la réaction commence à E₁. (Tada, Yamada et coll ; 1980). Ces expériences suggèrent que la phosphorylation du phospholambane accélère probablement la transition de E₂ en E₁ (étape 6), étape déterminante durant la formation de EP. La décomposition de EP est aussi accélérée par la phosphorylation du phospholambane. La phosphorylation du phospholambane augmente le taux (V/(EP)) entre l'hydrolyse de l'ATP (v) et les niveaux de EP (EP) obtenus à des concentrations en Ca (++) (0,1 à 10 μ M). L'augmentation de la vitesse de décomposition de EP résulte de la stimulation d'une des étapes 3,4 ou 5. Parmi ces étapes, la conversion de E₁p en E₂p (étape 4) peut être stimulée par la phosphorylation du phospholambane puisque cette étape est l'étape limitante de la décomposition de EP lorsque

des concentrations saturantes en Ca (++) , Mg (++) et K (+) sont présentes. Il est intéressant de noter que la phosphorylation du phospholambane régule les deux étapes déterminantes (étapes 4 et 6) pendant lesquelles l'affinité de l'ATPase pour le Ca (++) est totalement modifiée.

5 Effect of phospholamban phosphorylation on the reverse ATPase reaction (EP formation from Pi).

Cardiac microsomes	Initial velocity of EP formation
	$\mu\text{mol}/10\text{ms} \cdot \text{g protein}$
Control	0.029
Phosphorylated	0.076

Following pretreatment with cyclic AMP and protein kinase, cardiac sarcoplasmic reticulum was assayed for EP formation from Pi in the presence of a trace amount of Ca^{2+} , 10 mM Mg^{2+} and 5 mM ^{32}P i at 20 °C, employing a rapid chemical quench flow apparatus.

Table 6. Effect of phospholamban phosphorylation on the initial rate of EP decomposition of ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum.

Cardiac microsomes	k_d	
	Rapid phase (s^{-1})	Slow phase (s^{-1})
Control	8.41	1.24
Phosphorylated	13.54	1.24
Increase over control	1.6-fold	-

Following pretreatment of cardiac sarcoplasmic reticulum with cyclic AMP and protein kinase, the intermediate EP of cardiac sarcoplasmic reticulum was formed in the presence of 14 μM Ca^{2+} , 3 mM MgCl_2 and 10 μM $[\text{T-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ at 20 °C. After 120 ms, further formation of EP was terminated by chelation of Ca^{2+} with 2 mM EGTA, and the decay in the amount of EP was determined by rapid chemical quench flow apparatus. The first order rate constant, k_d , of EP decomposition was determined from semilogarithmic plots of decay in EP.

Tada, Yamada ; (1982)

Une partie du phospholambane est localisée à la surface cytoplasmique de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Une large portion de la molécule est insérée dans la membrane. Il est probable que la Protéine Kinase - CAMP dépendante catalyse la phosphorylation du phospholambane aboutissant à un changement conformationnel profond de cette molécule. Durant la phosphorylation, une partie de la molécule incluant le site de phosphorylation serait transloquée devenant moins accessible à la digestion par la trypsine. Le phospholambane phosphorylé exhibe une étroite association avec l'ATPase devenant ainsi plus difficile à dissocier de l'ATPase par un traitement aux détergents.

(Voir la figure 3).

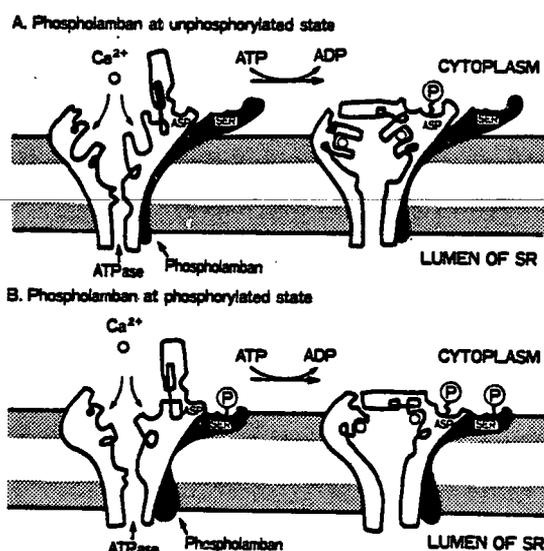


Fig. 3. Diagrammatic representation of the action of phospholamban on the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. *ASP* represents an aspartic acid residue in the ATPase and *SER* a serine residue in phospholamban. The phosphates attached to these amino acids are $\sim P$, the acyl phosphate ATPase intermediate, and $-P$, the regulatory phosphoester. (From Tada and Katz(1982))

Puisque la vitesse de relaxation du muscle cardiaque est déterminée par la vitesse d'enlèvement des ions Ca^{++} des protéines myofibrillaires, on a formulé l'hypothèse que la phosphorylation du phospholambane activée par l'AMPc joue un rôle dans l'accélération de la relaxation donc dans le raccourcissement de la systole induit par les catécholamines. Cette hypothèse n'ayant pas encore été vérifiée dans du tissu cardiaque intact, Lindemann et coll ont examiné les effets d'un agoniste β , l'isoprotérénol, sur la phosphorylation du phospholambane et sur l'activité de l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique isolé à partir de ventricules de cobaye perfusés. Ils ont trouvé que les effets de l'isoprotérénol sur la phosphorylation du phospholambane et sur l'ATPase calcique sont étroitement parallèles à la relaxation. Ces résultats fournissent l'évidence que la stimulation β adrénergique résulte de la phosphorylation du phospholambane et augmente l'activité Ca^{++} - ATPasique dans le ventricule du myocarde intact et fonctionnel. Ces découvertes confortent donc l'hypothèse que la stimulation du transport calcique du réticulum sarcoplasmique, induite par la phosphorylation

du phospholambane dépendante de l'AMPC, peut être à la base des effets relaxants de la stimulation β adrénergique du myocarde de mammifère. (Lindemann et coll ; 1983).

1.2.3 Régulation de la pompe à Ca (++) par le système calmoduline - phospholambane

Kirshberger et coll rapportent une augmentation de plusieurs fois du transport du Ca (++) et de l'activité Ca (++) ATPasique par des concentrations micromolaires de calmoduline, ceci dans les vésicules du réticulum sarcoplasmique de coeur de chien. Cette activation a lieu en présence de 120 mM de KCl. Cette stimulation du transport calcique par la calmoduline implique la phosphorylation de la protéine de PM = 22 000 D le phospholambane (Kirshberger, Antonetz ; 1982).

Lopaschuk et coll rapportent un doublement de l'activité de l'ATPase avec la calmoduline en l'absence de K (+) et seulement une faible stimulation du transport calcique à des concentrations en K (+) de 110 nM (Lopaschuk et coll ; 1980). Donc, si la régulation du transport calcique par la calmoduline joue un rôle significatif dans la cellule intacte, elle doit être opérationnelle à une concentration en K (+) intracellulaire supérieure à 110 nM (Kirshberger, Antonetz ; 1982).

La formation de cette phosphoprotéine ayant les caractéristiques d'une phosphoester est indépendante de la Protéine Kinase - cAMP dépendante et est catalysée par une Protéine Kinase endogène : la Protéine Kinase - Ca (++) calmoduline dépendante. Cette dernière est liée à la membrane car après 3 lavages avec 0,6 KCl, elle est toujours présente. Elle catalyse l'incorporation de la même quantité de Ph que la Protéine Kinase cAMP dépendante mais sur un site différent. (Le Peuch et coll ; 1979).

La phosphorylation du réticulum sarcoplasmique activée par la calmoduline augmente en même temps que

le PH passe de 5,5 à 8,5, alors que la phosphorylation par la Protéine Kinase - cAMP dépendante est maximale pour un PH = 7. De plus, on a une différence de sensibilité à la phénotiazine pour les 2 processus de phosphorylation, ceci confirme donc l'existence de deux Kinases différentes (Louis, Maffitt ; 1982).

La Protéine Kinase endogène a des points communs avec la glycogène phosphorylase Kinase b. Ainsi, cette Protéine Kinase Ca (++) calmoduline dépendante phosphoryle aussi la glycogène phosphorylase b et réciproquement, la glycogène phosphorylase Kinase b exogène catalyse la phosphorylation du phospholambane grâce à l'activation que provoque l'attachement à cette enzyme d'une sous-unité : la calmoduline. (Le Peuch et coll 1979).

Le taux de phosphorylation du phospholambane catalysé par la Protéine Kinase Ca (++) calmoduline dépendante est à peu près le même que celui trouvé pour la Protéine Kinase - cAMP dépendante. En accord avec la découverte que les phosphorylations du phospholambane catalysées par les deux Protéines Kinases se font à des sites différents, on en déduit qu'elles ont lieu indépendamment et qu'elles s'additionnent. (Tada, Inui ; 1983), (Tada, Wyskovsky et coll ; 1983).

Tada et coll ont de plus testés successivement la Protéine Kinase cAMP dépendante et la Protéine Kinase calmoduline dépendante quant à leur stimulation de l'activité ATPasique et de la prise de Ca (++) par le réticulum sarcoplasmique. La phosphorylation du phospholambane activée par l'AMPc est indépendante du Ca (++) tandis que celle activée par la calmoduline est dépendante du Ca (++) entre 0,2 et 50 μ M. Les deux processus de phosphorylation ont lieu indépendamment. Quand les deux Kinases sont fonctionnelles, les quantités de phosphorylation sont additives. Dans ces conditions, les phosphoprotéines

formées par la Protéine Kinase - cAMP dépendante ou la Protéine Kinase calmoduline dépendante migrent électrophorétiquement comme des molécules de 11000 D si l'électrophorèse en SDS-gel de polyacrylamide est précédée d'une ébullition de la préparation. (Tada, Inui, Yamada et coll ; 1983).

L'augmentation de la prise de Ca (++) médiatée par l'AMPc peut être observée même quand la phosphorylation dépendante de la calmoduline n'a pas lieu. Les effets stimulateurs de la Protéine Kinase cAMP dépendante et de la Protéine Kinase Ca (++) - calmoduline dépendante peuvent être additifs. Ces résultats sont en accord avec la découverte que la phosphorylation du phospholambane par les deux Kinases a lieu de manière indépendante et additive. L'activité ATPasique est aussi stimulée par la calmoduline à de faibles concentrations en Ca (++) de 0,1 à 50 μ M. Similairement, à la prise de Ca (++) , les effets des Kinases sur l'activité ATPasique peuvent avoir lieu indépendamment et additivement. (Tada, Inui, Yamada et coll ; 1983), (Tada, Inui ; 1983).

Au contraire, deux autres groupes (Le Peuch et coll ; 1979) et (Karsanov, Khugashvili ; 1983) prétendent que la prise de Ca (++) n'est pas augmentée par la phosphorylation cAMP dépendante du phospholambane en l'absence de phosphorylation dépendante de la calmoduline. Le Peuch et coll de plus soutiennent que la phosphorylation dépendante de la calmoduline ne peut pas affecter l'activité ATPasique. Ces divergences proviennent selon Tada et Inui ; 1983 des différences de concentrations employées dans ces expériences. Le groupe de Le Peuch utilise de fortes concentrations en Ca (++) (0,1 mM) qui doivent masquer l'augmentation due à l'AMPc de la prise de Ca (++) dans les vésicules du réticulum sarcoplasmique et la stimulation de l'ATPase par la calmoduline observées à des concentrations en Ca (++) en dessous de 10 μ M.

Quant à Louis et Maffitt en 1982, ils

montrent que si la phosphorylation du réticulum sarcoplasmique cardiaque dépendante de la calmoduline avait lieu durant la systole, elle se déroulerait alors à des concentrations en Ca (++) similaires à celles qui activent la prise de Ca (++) et la formation de la phosphoprotéine ATPasique. Il est manifeste que la phosphoprotéine ATPasique a une activité maximale à des concentrations en Ca (++) pour lesquelles la Kinase dépendante de la calmoduline est inactive. Donc, la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique est entièrement activée avant que la phosphorylation par la calmoduline n'ait lieu. La phosphorylation dépendante de la calmoduline est donc peu probable, selon eux, durant le fonctionnement normal du muscle cardiaque. Cette phosphorylation interviendrait pour la régulation du transport du Ca (++) dans certains états pathologiques. Cette déduction a été controversée par Tada et Inui en 1983 qui montrent que la phosphorylation du phospholambane dépendante de la calmoduline apparaît avoir lieu dans le coeur intact puisque l'inhibiteur de la calmoduline (la fluphénazine) réduit significativement la phosphorylation du phospholambane dans le coeur de rat perfusé.

Plank et coll montrent que l'activation de la phosphorylation Ca (++) - calmoduline dépendante par des concentrations en calmoduline de 300 nM, 100 nM et 30 nM donne des K_{Ca} de 0,83 μ M ; 1,44 μ M et 2,3 μ M et des coefficients de Hill de 4,13 ; 3,76 et 3,99 indiquant que les 4 sites de liaison du Ca (++) sur la calmoduline doivent être saturés pour obtenir l'activation de la Protéine Kinase régulée par le rapport Ca (++)/calmoduline. La modulation du transport du Ca (++) par la calmoduline, in vivo, est donc déterminée, principalement, par la concentration en calmoduline présente dans le sarcoplasme. (Plank, Pifl et coll ; 1983).

La phosphorylation du phospholambane est catalysée par deux Kinases ce qui suggère l'existence possible de populations différentes de monomères du phospholambane. Une molé-

1.2.4) Régulation de la pompe à Ca (++)
par le biais d'une Protéine Kinase dépendante du Ca (++) sti-
mulée par les lipides

Limás et coll constatent une stimulation d'une Protéine Kinase cytosolique dépendante du Ca (++) par les diacylglycerols insaturés. Cette stimulation est due à une augmentation de la sensibilité en Ca (++) de la Protéine Kinase. De plus, l'activation de cette Protéine Kinase entraîne à son tour une augmentation de l'activité de l'ATPase calcique.

Dans les cas d'hypertrophie cardiaque pour lesquels le niveau intracellulaire en Ca (++) est faible à cause de la diminution de la capacité du réticulum sarcoplasmique à accumuler le Ca (++) . Les diacylglycérols en stimulant la Protéine Kinase, permettraient de maintenir la fonction sarcoplasmique. (Limás ; 1980).

Wrenn et coll, de même, constatent que les phosphorylations dépendantes du Ca (++) des Protéines du cytosol du cortex cérébral de rat et de cobaye sont profondément stimulées par la phosphatidylserine. La calmoduline par contre n'a qu'un effet minime (Wrenn et coll ; 1980). Ces résultats sont en accord avec ceux de Takai et coll qui montrent sur le cerveau de rat une activation de la Protéine Kinase multifonctionnelle dépendante du Ca (++) par les phospholipides membranaires (Takai et coll ; 1979).

Ces découvertes suggèrent le rôle des phospholipides dans la phosphorylation, dépendante du Ca (++) , des protéines substrats endogènes.

1.3 Flux de sortie du Ca (++) au niveau du réticulum sarcoplasmique cardiaque

Kirchberger et coll ont mis en évidence que le

flux de Ca (++) du réticulum sarcoplasmique cardiaque de chien est augmenté par des concentrations micromolaires de Ca (++) extravésiculaires.

Quand les microsomes sont chargés avec du Ca (++) en présence de 50 mM de Pi, un flux maximal de Ca (++) de 150 à 200 m mole de Ca (++)/mg de protéine microsimale/mm est observé. La moitié de la stimulation maximale du flux de sortie du Ca (++) est obtenue pour 2 à 4 μ M de Ca (++) externe.

La sortie du Ca (++) des microsomes est semblable en plusieurs points à la prise de Ca (++) grâce à la pompe à Ca (++) :

- Les deux processus sont stimulés par des concentrations micromolaires en Ca (++) externe et par la Protéine Kinase catalysant la phosphorylation.

- Tous deux sont inhibés par de fortes concentrations en Ca (++) intravésiculaire.

Ces analogies suggèrent qu'un composant de la pompe calcique participe à la libération du Ca (++) du réticulum sarcoplasmique cardiaque (Kirshberger, Wrong ; 1978).

La protéine phosphorylée intervenant dans le flux de sortie du Ca (++) serait le phospholambane. (Tada, Inui ; 1983).

2) Au niveau du sarcolemme

Trois systèmes de transport du Ca (++) existent à travers le sarcolemme : un canal lent à Ca (++) ; une ATPase spécifique ; un échangeur Na (+) - Ca (++).

Le canal à calcium lent opère exclusivement dans la

direction du gradient électrochimique, donc dans le sens de l'entrée de cation, tandis que l'ATPase génère exclusivement par flux de sortie du Ca ($++$). Le Ca ($++$) entrant par le canal lent entraîne la libération du Ca ($++$) des espaces intracellulaires pour initialiser la contraction.

L'ATPase ayant une haute affinité pour le Ca ($++$) mais une faible vitesse de pompage est adéquate pour éjecter le Ca ($++$) durant la diastole. La direction du 3eme système, l'échangeur Na (+) - Ca ($++$) est un problème. Il était généralement accepté que l'échangeur contribuait à l'expulsion du Ca. Il semble plus vraisemblable que cette direction varie durant le cycle contraction-relaxation. (Caroni, Carafoli ; 1983).

Successivement seront considérés ces 3 types de transport et comment la phosphorylation protéique intervient dans ces transports.

2.1 Flux d'entrée de Ca ($++$) au niveau du sarcolemme

Cachelin et coll constatent que le 8 bromocyclic AMP augmente la probabilité d'ouverture des canaux calciques. Or, le 8 bromocyclic AMP augmente l'AMPc dans la cellule ce qui entraîne la phosphorylation du canal calcique ou d'une protéine qui lui est associée.

L'injection d'EGTA dans les fibres de Purkinje n'empêche pas l'augmentation du courant calcique induit par l'adrénaline. Donc, on suggère que les canaux calciques seraient modulés par un processus de phosphorylation dépendant de l'AMPc et que l'augmentation du flux d'entrée du Ca ($++$) résulte d'une plus grande probabilité d'ouverture des canaux Ca ($++$) lorsqu'ils sont phosphorylés (Cachelin ; 1983).

Le raccourcissement de la systole induit par l'épinéphrine est bien expliqué par la phosphorylation dépendante

de l'AMPc, du phospholambane, l'activateur de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique. Au contraire, le mécanisme moléculaire des effets inotropiques de ce β agoniste n'était pas expliqué jusqu'à la découverte récente que l'entrée de Ca (++) induite par la dépolarisation du sarcolemme, l'équivalent in vitro du canal lent à calcium, est activé par la phosphorylation dépendante de l'AMPc, d'une protéine du sarcolemme : la calciductine. La calciductine a été identifiée comme ayant un PM = 22 000 à 27 000 D (Rinaldi et coll ; 1982) et (Rinaldi et coll ; 1981).

Cette protéine d'environ 24 000 D est interconvertible en une protéine de 9 000 D son monomère. (Lamers et coll ; 1980).

La calciductine a été mentionnée par St Louis et coll qui ont mis en évidence la présence dans le sarcolemme de tous les éléments nécessaires à sa phosphorylation, en particulier d'une Protéine Kinase cAMP dépendante (St Louis, Sulakhe ; 1979). La calciductine se présente comme un excellent substrat de cette Protéine Kinase activée par l'AMPc puisque de faibles quantités de la sous unité catalytique environ 6 % sont suffisants pour atteindre le taux maximum à la fois de phosphorylation de la calciductine et d'activation de la prise de Ca (++) .

Les protéolipides du sarcolemme ont été entièrement extraites par des mélanges de solvant-acide organique et purifiées par des chromatographies en phase liquide. Ces protéolipides représentent 2 % des protéines du sarcolemme et ces 2 % contiennent essentiellement 97 % de calciductine et un composant de 14 000 à 16 000 D (soit 3 %). Ces protéolipides du sarcolemme sont phosphorylés sur les résidus séryl.

Leurs compositions en acides aminés indiquent la présence d'un grand nombre de résidus acides et hydrophobes ex-

pliquant le comportement de la calciductine comme une protéolipide acide similaire au phospholambane. Le phospholambane et la calciductine exhibent de frappantes différences dans leurs phosphorylations. Le phospholambane est phosphorylé par la cAMP dépendante Protéine Kinase, la phospholambane Kinase, dépendante du Ca (++) et de la calmoduline, la Protéine Kinase C, la Kinase stimulée par les lipides dépendantes du Ca (++)). Au contraire, la calciductine est seulement phosphorylée par la Protéine Kinase dépendante de l'AMPc. Ces différences ne sont pas indicatrices de différents accepteurs de phosphate mais peut être seulement d'environnements différents des membranes considérées.

La preuve de l'identité ou de la non identité du phospholambane et de la calciductine peuvent seulement être mis en évidence par l'étude de la structure primaire ou l'utilisation de sondes spécifiques tels que les anticorps monoclonaux. (Rinaldi et coll ; 1983).

Récemment, Capony et coll on isolé par chromatographie en phase liquide ces deux protéolipides, puis ils les ont soumis à une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de sodium Dodecyl sulfate. Ils ont alors constaté que le phospholambane et la calciductine ont un même PM de 11 000 D et un PI = 3,7. Leurs compositions en acides aminés sont similaires sinon identiques bien qu'ils appartiennent à des membranes différentes (Capony et coll ; 1983).

L'épinéphrine agit par l'intermédiaire de la phosphorylation de la calciductine qui serait soit le canal lui-même soit un activateur du canal lent sous sa forme phosphorylée. (Rinaldi et coll ; 1982), (Rinaldi et coll ; 1981).

2.2 Flux de sortie de Ca (++) au niveau du sarcolemme

Pour obtenir le raccourcissement de la systole observée à la suite de la stimulation hormonale, le processus de

transport actif du Ca (++) doit être stimulé. Il a été démontré que le processus de phosphorylation catalysé par l'AMPc et par la Protéine Kinase Ca (++) - calmoduline dépendante stimule la pompe à Ca (++) du réticulum sarcoplasmique. Pour prévenir la surcharge du réticulum sarcoplasmique avec le Ca (++), il apparaît nécessaire que l'expulsion du Ca (++) au niveau du sarcolemme soit aussi stimulée. Deux systèmes au niveau du sarcolemme sont responsables de l'expulsion du Ca (++), l'échangeur Na (+)/Ca (++) et l'ATPase calcique. Caroni et coll, lors de leur étude sur l'ATPase calcique, montrent qu'à la fois l'hydrolyse de l'ATP dépendante du Ca (++) et la pompe à Ca (++) sont affectées par la phosphorylation de l'ATPase. La phosphorylation dépendante du Ca (++) et du cAMP stimule l'activité de la pompe tandis que la déphosphorylation par une phosphatase l'inhibe. La phosphorylation affecterait le turn over de l'enzyme plutôt que son affinité pour le Ca (++) (Caroni, Carafoli ; 1981).

Lamers et coll rapportent qu'une protéine du sarcolemme de $M = 9\ 000\ D$ serait un substrat à la fois pour la Protéine Kinase Ca (++) calmoduline dépendante et pour la Protéine Kinase cAMP dépendante. La phosphorylation cAMP dépendante de cette protéine cause une augmentation de 1,6 fois de l'affinité de la pompe à calcium pour le Ca (++) sans modifier sa vitesse maximum. Aucun effet n'est observé si les membranes sont phosphorylées par la Kinase Ca (++) calmoduline dépendante. La moitié de l'activation maximale de cette dernière enzyme est obtenue pour des concentrations en Ca (++) de $1\ \mu M$ suggérant qu'elle doit être opérative in vivo seulement aux concentrations en Ca (++) présentes durant la systole (Lamers et coll ; 1981).

Wetter et coll utilisaient des vésicules hautement purifiées de sarcolemme mettant ainsi en évidence une stimulation de 1,8 fois du transport actif du Ca (++) après phosphorylation des protéines du sarcolemme en présence de calmoduline et de la sous unité C de la Protéine Kinase cAMP dépendante. La

stimulation du transport actif est beaucoup moins importante quand la phosphorylation est faite, soit par la sous unité C de la Protéine Kinase cAMP dépendante, soit par la calmoduline. Les effets de la calmoduline et de la sous unité catalytique sont donc potentiels plutôt qu'additifs. La préphosphorylation des membranes plasmiques cardiaques entraîne une augmentation du taux de Ca (++) accumulé, ceci aussi bien pour de faible concentration en Ca (++) que pour des concentrations saturantes en Ca (++) . Ceci est contraire au transport du Ca (++) dans les membranes du réticulum sarcoplasmique où la phosphorylation des membranes du réticulum sarcoplasmique affecte la prise de Ca (++) significativement seulement à des concentrations en Ca (++) $\leq 1 \mu\text{M}$. (Wetter et coll ; 1982).

Velema et coll sont plus nuancés en ce qui concerne l'effet de la phosphorylation des protéines du sarcolemme sur le transport actif du Ca (++) au niveau du sarcolemme. Utilisant des vésicules de membrane plasmique cardiaque parfaitement isolés, ils ont mis en évidence une inhibition ou une stimulation de la pompe à Ca (++) en fonction du taux de protéine du sarcolemme et du rapport Protéine Kinase sur Protéine du sarcolemme. L'accumulation de Ca (++) dépendante de l'ATP dans les vésicules de sarcolemme représente une sortie active de Ca (++) in vivo. Cette sortie de Ca (++) participe à la diminution de la concentration en Ca (++) cytosolique. Si le rapport Protéine Kinase/Protéine sarcolemmique est faible, la Protéine Kinase cAMP dépendante est activée et le transport de Ca (++) par le sarcolemme est stimulé. Quand ce rapport est élevé, le transport actif du Ca (++) est inhibé ce qui suggère qu'un niveau élevé de phosphorylation des protéines du sarcolemme dû à une augmentation de la quantité de Protéine Kinase, induit une inhibition de la pompe à Ca (++) .

L'ouverture du canal à calcium lent du sarcolemme est aussi modulé par une phosphorylation dépendante de l'AMPC, une telle phosphorylation inhibe la prise de Ca (++) en ouvrant les canaux calciques de la membrane. A la fois l'inhibition de la

pompe à calcium et l'ouverture des canaux Ca (++) peuvent être interprétés comme participant à l'effet inotropique positif des catécholamines (Velema et coll ; 1983).

Il résulte de tout ceci que l'on ne sait toujours pas si la pompe à Ca (++) elle même est le substrat de la Protéine Kinase cAMP dépendante ou s'il s'agit d'une protéine qui lui est associée. (Haïech, Demaille ; 1983).

2.3 La régulation de l'échangeur Na (+)/Ca (++)

Les études sur l'échangeur Na (+)/Ca (++) ont progressées depuis l'utilisation de vésicules de sarcolemme. Il a alors été établi que l'échangeur est réversible, il a une relativement faible affinité pour le Ca (++) , il a une vitesse maximale de transport qui est 30 fois plus forte que celle de l'ATPase. La stoechiométrie probable est 3 Na (+)échangé contre 1 Ca (++) . Philipon et coll montrent qu'à la fois le Ca (++) externe et le Na (+) externe induisent l'efflux calcique à partir de vésicules de sarcolemme isolées de ventricules de chien. (Philipon, Nishimoto ; 1981).

L'électrogénicité de l'échangeur suggère qu'il pourrait opérer en direction de l'entrée de Ca (++) durant la phase en plateau du potentiel d'action. Jusqu'ici, la régulation possible de l'échange Na (+)/Ca (++) par les cycles phosphorylation - dephosphorylation n'apparaît pas, mais les effets stimulants de l'ATP sur l'échangeur dans les membranes axonales ont été décrits. Dans les axones, il a été montré que l'ATP stimulait le flux de sortie du Ca (++) de cellules exposées au Na (+) aussi bien que le flux de sortie du Na (+) des cellules en suspension dans un milieu riche en Ca (++) .

L'observation que seul les analogues hydrolysables de l'ATP sont capables d'activer l'échangeur montre qu'une étape de phosphorylation est impliquée. L'échangeur Na (+)/Ca (++) du sarcolemme du coeur de veau est activé par un traitement avec

ATP, Mg (++) et Ca (++) et désactivé par un traitement avec une phosphorylase phosphatase. L'effet de cette dernière peut être substitué par un traitement avec Mg (++) , Ca (++) et la calmoduline. Le processus d'activation ne nécessite pas l'addition de la calmoduline mais est inhibé par les antagonistes de la calmoduline. De toute évidence, la calmoduline endogène est nécessaire et suffisante. La moitié de l'activation maximale est obtenue pour $2\mu\text{M}$ de Ca (++) . La calmoduline ajoutée diminue le km du processus activateur à $0,8\mu\text{M}$. Des expériences avec de l'ATP marqué ont montré que le traitement activateur s'exerce à travers une Kinase et le traitement désactivateur à travers une phosphatase. L'opération concertée des 2 enzymes est rendue possible grâce à leur affinité différente pour le Ca (++) . A des concentrations saturantes en Ca (++) , la quantité d'ATP peut influencer la balance des 2 enzymes. (Caroni, Carafoli ; 1983).

3) Pertinence physiologique de tels systèmes

Les deux principaux effets mécaniques des catécholamines sur le myocarde sont l'augmentation de la contractilité, c'est-à-dire l'effet inotropique positif et le raccourcissement de la systole.

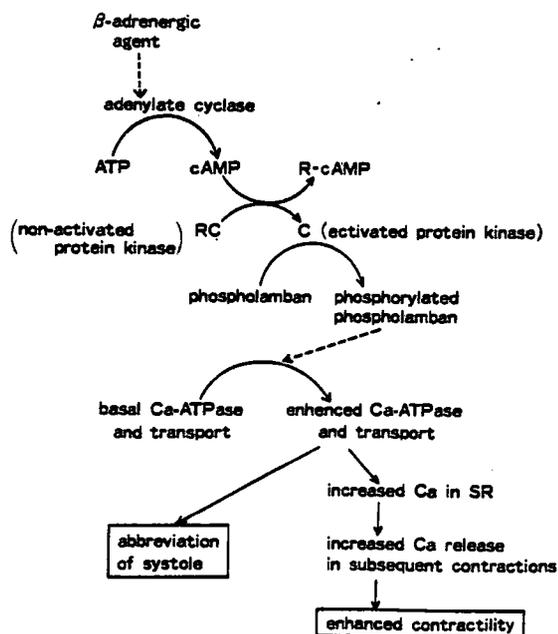


Fig. 5. A possible mechanism for β -adrenergic effects on contractility, mediated by enhanced Ca uptake by the sarcoplasmic reticulum (SR). RC represents protein kinase in soluble form or in association with SR membranes. R represents the regulatory subunit, C the catalytic subunit of the protein kinase. Tada, Yamada ; (1982)

De tels effets des catécholamines sont supposés être produits durant le couplage excitation-contraction en altérant les flux de Ca (++) à travers les deux principales membranes le réticulum sarcoplasmique et le sarcolemme dans les cellules myocardiques.

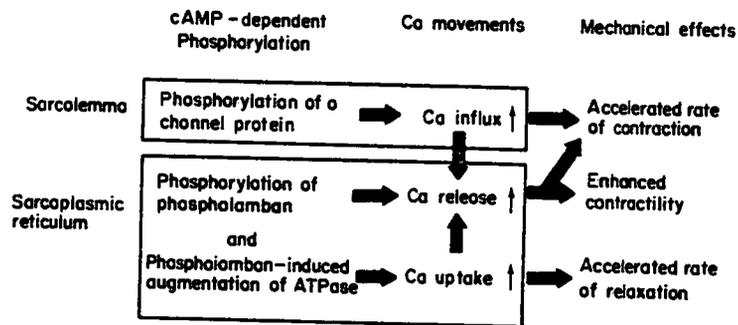


FIGURE 6. Role of membrane phosphorylation in augmentation of Ca fluxes during catecholamine-induced mechanical responses of the myocardium. The β -adrenergic actions of catecholamines, inducing several mechanical responses on the heart, were interpreted to be mediated by cAMP-dependent phosphorylation and subsequent augmentation of Ca fluxes in two principal membranes, sarcolemma and SR. The chain of events taking place in SR, the main topics in the present review, were compared with those in sarcolemma. In the latter, an increased Ca influx associated with phosphorylation of a channel protein [42] would cause accelerated rate of contraction by either or both of the following mechanisms: (a) Increased Ca influx could directly augment the contraction by increasing the intracellular Ca^{2+} , (b) Increased Ca influx enhances Ca-induced Ca release in SR, thus augmenting the rate of contraction.

Tada, Inui ; (1983)

Le cAMP et le système phospholambane - ATPase du réticulum sarcoplasmique peuvent altérer l'accumulation de Ca (++) et, plus tard, le taux de libération du Ca (++) . Le flux d'entrée du Ca (++) à travers la membrane du sarcolemme est augmenté durant la stimulation β adrénergique des cellules myocardiques. L'effet est dû à une stimulation cAMP dépendante du canal protéique. La protéine phosphorylée exhibe des caractéristiques simi-

laire à celles du phospholambane.

En présence de cAMP, l'accélération de la prise de Ca (++) par le système ATPase - phospholambane peut expliquer l'accélération de la relaxation car l'augmentation de la prise de Ca (++) par le réticulum sarcoplasmique diminue la quantité de Ca (++) fixée à la troponine. Un tel effet peut éventuellement augmenter la quantité de Ca (++) stockée dans le réticulum sarcoplasmique en retenant dans le réticulum sarcoplasmique une partie du Ca (++) qui aurait été autrement perdu durant le diastole.

Les catécholamines induisent une augmentation du flux d'entrée du Ca (++) au travers du sarcolemme, ce qui entraîne les deux effets suivants sur le réticulum sarcoplasmique.

- augmentation de la libération du Ca (++) induite par le Ca (++) intracellulaire, à partir du réticulum sarcoplasmique.
- augmentation des quantités de Ca (++) accumulées par le réticulum sarcoplasmique.

L'augmentation de l'influx de Ca (++) à travers le sarcolemme augmente la libération de Ca (++) du réticulum sarcoplasmique grâce à un mécanisme induit par le Ca (++) lui-même. La libération accrue de Ca (++) à partir du réticulum sarcoplasmique augmente à son tour à la fois le niveau et la durée des contractions myofibrillaires.

Grâce à l'aequorine, protéine bioluminescente sensible au Ca (++) , on mesure la concentration en Ca (++) cytoplasmique et on montre que les catécholamines augmentent à la fois la libération de Ca (++) du réticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme durant la phase précoce de la contraction et le repompement du Ca (++) dans le réticulum sarcoplasmique durant la relaxation.

Le fait que la quantité d'AMPc intracellulaire augmente avant le développement de la contraction, après l'exposition du coeur aux catecholamines est encore l'objet de controverse. Même si les catécholamines ne causent pas une augmentation significative de l'AMPc, une subtile augmentation de l'AMPc dans une région précise intracellulaire peut donner lieu à des changements mécaniques significatifs.

B) Phosphorylation des protéines intervenant dans le transport du Ca (++) au niveau du muscle squelettique

1) Phosphorylation de la protéine de PM = 100 000 D du réticulum sarcoplasmique

Les protéines du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin fixent spécifiquement le 8 azido - AMP cyclique marqué au P^{32} . Ces protéines représentent les Protéines Kinases cAMP dépendante. Ceci suggère une modulation du transport du Ca (++) par phosphorylation protéique. (Lord, Richards ; 1981).

Kranias et coll présentent l'évidence que le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin contient une Protéine Kinase intrinsèque indépendante de l'AMPc qui peut phosphoryler un composant membranaire endogène. La stabilité chimique de cette protéine phosphorylée indique que le phosphate est lié à la protéine du réticulum sarcoplasmique par une liaison phosphoester. L'addition de Protéine Kinase exogène dépendante de l'AMPc augmente la phosphorylation du réticulum sarcoplasmique de 25 à 100 %.

Kirshberger, Tada ; (1976) et Caswell et coll n'avaient pas pu mettre en évidence une phosphorylation des microsomes squelettiques car leurs expériences n'avaient pas lieu aux conditions optimales (Haute activité spécifique de l'ATP [P^{32}], préincubation des membranes à 30 ° C avant le début de la réaction

protéine du réticulum sarcoplasmique à une concentration de 1 mg/ml, forte AS de la Protéine Kinase exogène). La Protéine Kinase du réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique de lapin est inhibée à des concentrations en Ca (++) > à 10^{-8} M, indiquant qu'il ne s'agit pas d'une phosphorylase Kinase. Le marquage indique que la phosphorylation du réticulum sarcoplasmique est régulée par le Ca (++) . La phosphorylation est donc susceptible de jouer un rôle important durant le cycle contraction-relaxation. La Protéine Kinase du réticulum sarcoplasmique, contrairement aux enzymes solubles, n'est pas inhibée par l'inhibiteur protéique thermostable. La Protéine Kinase du réticulum sarcoplasmique serait, soit une Protéine Kinase indépendante de l'AMPc, soit la sous unité catalytique d'une holoenzyme dépendante de l'AMPc qui est liée à la membrane de telle façon que le site d'action de l'inhibiteur protéique soit bloqué.

La phosphorylation des membranes du réticulum sarcoplasmique squelettique par les Protéines Kinases endogènes et exogènes a lieu sur un polypeptide de $P_M = 100\ 000$ D différent de la protéine de $20\ 000$ D qui est phosphorylée dans les microsomes cardiaques. La phosphorylation de la protéine de $100\ 000$ D par la Protéine Kinase endogène stimule à la fois le taux de transport calcique et l'activité Ca (++) - ATPase. La phosphorylation par la Protéine Kinase exogène dépendante de l'AMPc a un effet stimulateur plus prononcé sur la pompe calcique (Kranias, Bick ; 1980).

Varsanyi et coll montrent que l'incorporation d'alkylphosphate dans un polypeptide de $P_M = 100\ 000$ D du réticulum sarcoplasmique intact du muscle squelettique représente la phosphorylation de l'ATPase du transport du Ca (++) . Ceci car :

(i) le maximum d'alkylphosphate incorporé qui atteint 0,7 mole/molécule de $100\ 000$ g correspond à une phosphorylation stoechiométrique de l'ATPase du transport du Ca (++) , puisque cette protéine représente environ 70 % des protéines totales du réticulum sarcoplasmique.

(ii) la phosphorylase Kinase catalyse l'incorporation de phosphate sous forme d'alkylphosphate dans l'ATPase purifiée du transport du Ca (++) à peu près en quantité identique.

L'incorporation de phosphate dans l'ATPase peut être observée sous 2 conditions :

- (i) à des concentrations nanomolaires en Ca (++) ,
- (ii) à des concentrations micromolaires de Ca (++) en l'absence ou en présence de phosphorylase Kinase.

L'incorporation à une concentration nanomolaire de Ca (++) est catalysée par une Protéine Kinase, indépendante du Ca (++) , liée à la membrane. Cette Protéine Kinase est différente de la phosphorylase Kinase et de la Protéine Kinase cAMP dépendante puisque la phosphorylation n'est ni inhibée par les anticorps anti-phosphorylase kinase ni par l'inhibiteur thermostable de la protéine kinase dépendante de l'AMPc.

A des concentrations micromolaires en Ca (++) et sans addition de phosphorylase Kinase, l'ATPase incorpore sous forme d'alkylphosphate 50 % de la quantité de phosphate qui est incorporée lorsque la concentration en Ca (++) est de l'ordre de la manomole.

La phosphorylation est alors catalysée par la Protéine Kinase endogène indépendante du Ca (++) . L'addition de phosphorylase Kinase augmente la quantité d'alkylphosphate. Donc, les phosphorylations observées auraient lieu sur 2 sites, l'un impliquant la Protéine Kinase endogène, l'autre la phosphorylase Kinase ajoutée. (Varsanyi, Heilmeyer ; 1981).

Il résulte de ceci que ni la nature de l'alkylphosphate ni celle de la Kinase qui catalyse cette formation d'alkylphosphate n'a été clairement identifiée.

Varsanyi et coll en 1983 rapportent qu'un phosphatidylinositol phosphate est formé sur l'ATPase calcique et ceci en corrélation avec une activation de l'ATPase.

Une mole de phosphatidylinositol phosphate est formée par mole d'ATPase calcique quand l'enzyme est incubé avec ATP et Mg (++). La phosphorylation de ce phosphatidylinositol associée à l'enzyme représente l'alkylphosphate décrit par les mêmes auteurs en 1981. La phosphorylation d'une mole de phosphatidylinositol par protéine de 100 000 D est corrélée avec une augmentation de 7 fois de l'affinité pour le Ca (++) et du turn over maximal de l'enzyme.

On est dans l'impossibilité de rompre la liaison entre le phosphatidylinositol phosphate et la protéine puisque une partie du phospholipide acide co-migre durant l'électrophorèse sur SDS avec l'ATPase calcique et l'autre partie avec un composant de 9 000 - 10 000 D. Le phosphatidylinositol semble être associé avec la partie hydrophobe de l'enzyme. Cette dernière partie doit contenir un protéolipide avec lequel le phosphatidylinositol phosphate est associé, à en juger par l'extraction du complexe avec un solvant acide organique et par son comportement durant la chromatographie sur Sephadex LH 60. (Varsanyi et coll ; 1983).

2) Phosphorylation d'une protéine de PM = 60 000 D du réticulum sarcoplasmique

Michalak et coll ont montré qu'une glycoprotéine de PM = 53 000 D est présente avec l'ATPase à un taux constant dans les préparations de réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique. Ils ont donc proposé que cette glycoprotéine, analogue à la sous unité glycoprotéique de l'ATPase membranaire (Na (+), K (+)), soit impliquée dans la régulation de l'ATPase calcique (Michalak et coll ; 1980). Ceci est en accord avec les travaux de Chiesi et coll qui ont constaté que l'accumulation de Ca (++) et l'hydrolyse de l'ATP dépendante du Ca (++) par le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique sont inhibés par le trifluoperazine. L'inhibition, dépendante de la présence de Ca (++) , est de 90 % avec 14 μ M de trifluopérazine et 0,24 M de Ca (++) . La trifluoperazine interagit fortement avec 2 protéines du réticulum sarco-

plasmique : la calmoduline et la glycoprotéine de 53 000 D. Ces 2 protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité. L'inhibition de l'activité du réticulum sarcoplasmique par la trifluoperazine est corrélée avec l'interaction de la drogue, avec la glycoprotéine plutôt qu'avec la calmoduline. Le principal effet de cette inhibition est un changement dans l'ATPase (Ca (++) - Mg (++)) qui passe d'une forme à forte affinité à une forme à faible affinité. De plus, Chiesi et coll ont mis en évidence la phosphorylation dépendante de la calmoduline de 3 protéines de PM = 57 000, 35 000 et 20 000 D de la membrane du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique. La phosphorylation de ces 3 protéines, selon eux, ne joue aucun rôle dans la régulation de la prise de Ca (++) par transport actif (Chiesi, Carafoli ; 1982).

Campbell et coll montrent eux aussi que la phosphorylation, dépendante du Ca (++) et de la calmoduline, d'une protéine de PM = 60 000 est observée dans les membranes purifiées de réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique. La phosphorylation de cette protéine est stimulée par NaF qui est un inhibiteur de la protéine phosphatase. Cette phosphorylation atteint son taux maximum d'environ 55 pmole/Mg de protéine en 90 s et n'est pas affectée par l'AMPc. La moitié du taux de phosphorylation maximale est obtenue à 0,1 μ M de calmoduline. Le taux maximum de phosphorylation demande 0,6 μ M de calmoduline et 0,3 μ M de Ca (++) . La phosphorylation dépendante de la calmoduline de la protéine de 60 000 D est inhibée par la trifluopérazine avec un Ki de 5 μ M. Le pH optimum est en dessous de 6,0. La phosphorylation est inhibée à 90 % à pH = 8. La protéine de 60 000 D contient de la phosphosérine, de la phosphothréonine mais pas de phosphotyrosine. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en 2 dimensions, et l'immunoprécipitation montrent que la phosphoprotéine de 60 000 D n'est pas le calsequestrin. La digestion par les endo β - N acetylglucosaminidases H et D ne modifie pas son PM indiquant qu'il ne s'agit pas d'une glycoprotéine contrairement à ce que pensaient Michalak et coll ; 1980 et Chiesi, Carafoli ; 1982. Campbell et coll montrent aussi que la phosphorylation de la protéine intervient dans l'accumulation du Ca (++) dans les vésicules du réticulum sarcoplasmique.

En effet, la préparation des vésicules du réticulum sarcoplasmique avec l'EGTA, qui supprime l'action de la calmoduline, diminue les phosphorylations endogènes. On observe alors une diminution de l'accumulation du Ca (++) dans les vésicules du réticulum sarcoplasmique.

Un fort PM inhibant la phosphorylation diminue l'accumulation de Ca (++) dans les vésicules du Réticulum sarcoplasmique. La phosphorylation, dépendante du Ca (++) et de la calmoduline, de la protéine de PM = 60 000 D du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique est impliquée dans la fermeture d'une porte du canal par lequel se fait la libération du Ca (++) , auparavant ouverte en l'absence du gradient de protons.

On ne sait pas si la protéine de 60 000 D peut elle même être le canal de sortie du Ca (++) ou s'il s'agit d'une Kinase qui fonctionne dans une cascade de réactions impliquées dans la libération du Ca (++) . On pense que sa concentration dans la membrane serait suffisante pour permettre la libération de Ca (++) puisque seulement quelques canaux sont nécessaires à la libération du Ca (++) observée in situ. (Campbell, Mac Lennan ; 1982).

3) Mécanisme de la stimulation de l'ATPase Ca (++) dépendante du réticulum sarcoplasmique

Plusieurs phosphoprotéines ont été identifiées, elles sont associées avec les vésicules du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique mais leurs rôles n'ont pas été clairement définis.

Des substrats protéiques de la Protéine Kinase dépendante de la calmoduline de PM entre 20 000 et 90 000 ont été identifiées par Campbell, Mac Lennan ; 1982 ; Chiesi, Carafoli ; 1982. Campbell et coll, comme nous l'avons vu, suggèrent un rôle de la phosphorylation, dépendante de la calmoduline, des protéines du réticulum sarcoplasmique squelettique dans la régulation du transport calcique. Par contre, Chiesi et Carafoli en 1982 estiment que la phosphorylation dépendante de la calmoduline ne joue pas de rôle

dans la régulation de la prise de Ca ($++$). Donc, les effets de la phosphorylation dépendante de la calmoduline sur les vésicules du réticulum sarcoplasmique squelettique ne sont pas clairement établis.

Kranias, Mandel et coll, en 1980, ont montré que le réticulum sarcoplasmique squelettique contient une phosphoprotéine de $PM = 100$ K Dalton et que cette phosphorylation est à relier à l'augmentation de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP et à la prise de Ca ($++$). Dans une nouvelle publication, Kranias élucide le mécanisme par lequel la phosphorylation du réticulum sarcoplasmique squelettique régule l'activité de l'ATPase calcique.

Dans le réticulum sarcoplasmique, la phosphorylation par la Protéine Kinase cAMP dépendante résulte en une stimulation du transport calcique et de l'ATPase calcique. La phosphorylation a lieu alors sur une protéine de 22 K Dalton, le phospholambane. Cette phosphorylation entraîne une augmentation des niveaux de E \sim P et une augmentation de la vitesse de décomposition de E \sim P. Il est possible que la protéine de 100 K Dalton du réticulum sarcoplasmique squelettique joue un rôle régulateur sur la pompe calcique ceci d'une manière analogue à la protéine de 22 K Dalton: le phospholambane. Pour déterminer le mécanisme moléculaire par lequel la phosphorylation du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique régule l'ATPase calcique, on a étudié l'effet de la Protéine Kinase sur les étapes de la réaction Ca ($++$) ATPase. On rapporte que la phosphorylation provoque une stimulation marquée des taux initiaux de formation et de décomposition de E \sim P. Ces découvertes suggèrent que la Protéine Kinase doit réguler les étapes élémentaires de l'activité Ca ($++$) ATPase du réticulum sarcoplasmique squelettique et que le mécanisme de la régulation est analogue à celui du réticulum sarcoplasmique cardiaque. Donc, il n'est probablement pas essentiel d'avoir une phosphoprotéine spécifique dans le réticulum sarcoplasmique mais la localisation de cette protéine dans le microenvironnement de l'ATPase calcique est important pour les effets de cette phosphorylation sur l'activité Ca ($++$) - ATPase. (Kranias et coll ; 1983).

C) Phosphorylation des protéines intervenant dans le transport du Ca (++) au niveau des cellules sanguines

1) Dans les plaquettes du sang humain

Les plaquettes sont des fragments anuclés de mégakaryocytes constituant des modèles très utilisés pour étudier le couplage excitation-contraction.

Le Peuch et coll isolent des vésicules dont la face cytoplasmique est orientée vers l'extérieur. Ils montrent que ces vésicules accumulant le Ca (++) contiennent une (Ca (++) - Mg (++) ATPase de PM = 120 000 D. L'intermédiaire Acylphosphate (E~P) obtenue après incubation de la pompe en présence de Mg ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP est sensible à l'hydroxylamine. De plus, ils montrent qu'après incubation de ces vésicules avec la sous unité catalytique de la Protéine Kinase cAMP dépendante une protéine membranaire de PM = 23 000 est phosphorylée. Une telle phosphorylation a aussi été décrite par Käser-Glanzmann et coll en 1979. Cette phosphorylation de la protéine de PM = 23 000 n'a aucun effet sur la prise de Ca (++) ou sur l'activité de l'ATPase (Ca (++)-Mg (++)). Au contraire, le flux du Ca (++) à partir de ces vésicules est doublé après la phosphorylation cAMP dépendante de la protéine de PM = 23 K Dalton.

Ce polypeptide de PM = 23 K Dalton est comparé au phospholambane l'activateur phosphorylable de l'ATPase (Ca (++)-Mg (++) dans le réticulum sarcoplasmique cardiaque. Excepté un PM similaire, la phosphoprotéine des plaquettes diffère strictement du phospholambane. Après traitement par des détergents non ioniques (Triton X 100) et après électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate on n'observe aucune dissociation de cette phosphoprotéine alors que le phospholambane est dissocié en monomères de 11 KD. En plus, le polypeptide des plaquettes est un bon substrat pour la sous unité catalytique de la Protéine Kinase cAMP dépendante mais n'apparaît pas être phosphorylé par la Protéine Kinase calcium calmoduline dépendante. Au contraire, comme nous l'avons vu, le phospholambane est phosphorylé par la Protéine Kinase cAMP dépendante, par une Protéine Kinase Ca (++) - calmoduline dépendante et aussi par une Protéine Kinase cytosolique activée par le calcium et dépendante des phospholipides. Cette dernière Kinase est en très forte

concentration dans les plaquettes mais ne semble pas phosphoryler la protéine de PM = 23 000 D des plaquettes. Cet accepteur de phosphate de PM = 23 000 n'est pas phosphorylé quand les vésicules sont incubées en présence de Ca (++) ou en présence de Ca (++) et de calmoduline. Cette calmoduline est liée aux vésicules et représente 0,5 % de la fraction membranaire. Dans le cytosol des plaquettes, on trouve 4 protéines majeures fixant la calmoduline (PM = 94 000, 87 000, 60 000 et 43 000) et quelques protéines mineures fixant la calmoduline dans la fraction membranaires (PM = 69 000, 57 000, 39 000 et 37 000).

La calmoduline n'a pas d'effet sur le flux de sortie du Ca (++) quand elle est ajoutée en présence ou en l'absence de la sous unité catalytique de la Protéine Kinase. Le flux de sortie calcique stimulé par la phosphorylation cAMP dépendante est dans tous les cas dirigée vers le compartiment riche en Mg ATP, c'est-à-dire le cytosol. (Le Peuch et coll ; 1983).

2) Dans les lymphocytes du sang humain périphérique

Dans les lymphocytes, un stimulus mitogénique produit un influx de Ca (++) et cette entrée de Ca (++) est nécessaire à la transformation blastique. La pompe calcique de la membrane plasmatique doit être présente pour compenser ces chargements de Ca (++) cellulaire. Elle assure une distribution physiologique des ions Ca (++) entre les cellules et leur environnement.

Sarkadi et coll cherchent à caractériser le transport membranaire du Ca (++) dans les lymphocytes humains qui peuvent constituer un modèle de régulation de la pompe calcique. Les caractéristiques de la pompe à calcium sont étudiées dans les lymphocytes intacts du sang périphérique et dans des vésicules retournées préparées à partir de membranes plasmatiques. Les vésicules retournées servant aussi à étudier la phosphorylation membranaire induite par le Ca (++) à partir de l'ATP.

Les lymphocytes intacts sont chargés avec du Ca (++) par une courte exposition avec l'ionophore A 23187. Après l'élimination de ce ionophore, une sortie de Ca (++) dépendante de l'ATP se produit. La pompe à calcium dans les lymphocytes intacts

est insensible à l'ouabaine et, jusqu'à ce que l'ATP cellulaire soit en quantité suffisante, à l'oligomycine et au dinitrotriphénol.

Les vésicules retournées, préparées par lyse hypotonique des lymphocytes intacts, montrent une prise de Ca (++) dépendante de l'ATP et de Mg (++) . Ce transport calcique est insensible à l'ouabaine, à l'oligomycine ou au dinitrotriphénol tandis qu'il est bloqué par le lanthanum et la quercetin. La calmoduline stimule significativement la pompe calcique dans les vésicules lavées à l'EDTA. La prise de Ca (++) , respectivement dépendante de l'ATP et indépendante, montre différents taux de dépendance vis à vis du Ca (++) .

Quand les vésicules retournées sont incubées en présence d'ATP marqué, une incorporation de P ³² induite par le Ca (++) se fait sur une protéine de PM = 120 - 150 000 D. Le poids de cette protéine varie suivant la méthode de lavage utilisée avec EDTA ou sans EDTA. La phosphorylation de la protéine de PM = 150 000 est en corrélation étroite avec une activation par la calmoduline. La stimulation par la calmoduline de la pompe à Ca (++) a lieu par la liaison d'une sous unité de la pompe de PM = 20 - 30 000 à la surface de la membrane interne. Cette sous unité est susceptible d'attaque protéolytique. La protéolyse active la pompe à Ca (++) et supprime la possibilité de stimulation par la calmoduline et la liaison du Ca (++) à l'enzyme. La sensibilité à la stimulation par la calmoduline et la protéolyse partielle de la pompe à calcium sont en relation inverse. (Sarkadi et coll ; 1982).

3) Dans les erythrocytes

Dans les plaquettes aucun effet de la calmoduline sur la prise de Ca^{++} n'a été mis en évidence. Par contre, pour les erythrocytes, grâce à l'emploi de l'azido I^{125} calmoduline, dérivé radioactif photoactivable de la calmoduline, Hinds et coll mettent en évidence une fixation de ce dérivé à l'ATPase (Ca^{++} - Mg^{++}).

Le produit obtenu a un PM de 168 000 D, il représente l'ATPase de PM = 150 000 D ayant fixée la calmoduline. La quantité de produit formé est en corrélation avec l'augmentation de l'activité basale de l'ATPase (Ca^{++} - Mg^{++}) et l'augmentation du transport basal du Ca^{++} . (Hinds, Andreasen ; 1981).

Weller dans son livre cite une action de l'AMP cyclique sur la perméabilité au Ca^{++} des préparations membranaires d'erythrocytes de poulet par un processus qui n'implique pas la phosphorylation protéique. Le cAMP seul augmente la perméabilité au Ca^{++} , par contre la phosphorylation des protéines cAMP dépendante dans la membrane erythrocytaire diminue la perméabilité au calcium sans affecter celle aux autres ions. (Weller ; 1979).

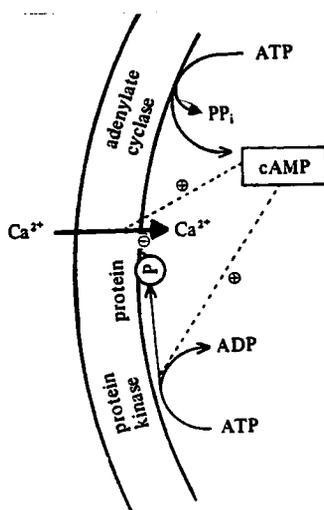


Figure 7 A hypothetical scheme for the relation between cyclic AMP and protein phosphorylation in the control of Ca^{2+} permeability. A plus sign indicates stimulation and a negative sign inhibition.
Weller ; (1979)

Conclusion

La phosphorylation protéique intervenant dans la régulation du transport du Ca (++) est un phénomène relativement bien connu au niveau du coeur. Ainsi la preuve a été faite que la stimulation β adrénergique résulte de la phosphorylation du phospholambane (Lindemann et coll ; 1983). Seulement quelques points obscurs subsistent au niveau de ce tissu , aussi pour le moment le mécanisme moléculaire par lequel le phospholambane sous sa forme phosphorylée accroît l'activité de l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique est inconnu. Au niveau du sarcolemme, on ignore si la pompe elle-même ou une protéine qui lui est associée est le substrat de la Protéine Kinase cAMP dépendante.

Pour le muscle squelettique, la nature de la protéine de PM = 60 000 D reste à déterminer ainsi que son rôle éventuel quand elle est phosphorylée dans l'augmentation de la prise de Ca (++) .

En ce qui concerne les erythrocytes, on a observé contrairement aux tissus précédents une diminution de la perméabilité au Ca (++) par la phosphorylation protéique.

Wüthrich et Steck en 1981 ont étudié le rôle de la phosphorylation sur la perméabilité des vésicules membranaires myéliniques de cerveau bovin et n'ont noté aucune différence de diffusion du Ca (++) , que la protéine basique myélinique soit phosphorylée ou non.

Il résulte donc que ces études sur les membranes de mammifères révèlent des différences marquées en ce qui concerne le rôle de la phosphorylation des protéines dans la perméabilité au Ca (++) .

IV) BIBLIOGRAPHIE

- A.N.R.T. (Association Nationale de la Recherche Technique), 1980. Bases et banques de données accessibles en conversationnel en France. Paris.

- CACHELIN A.B., DE PEYER J.E., 1983. Ca (++) channel modulation by 8 bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature*. 304 : 462 - 464.
- CAMPBELL K.P., MAC LENNAN D.H., 1982. A calmodulin dependant Protein Kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Phosphorylation of a 60 000 Dalton protein. *J. Biol. Chem.* 257 : 1238 - 1246.
- CAPONY J.P., RINALDI M.L., GUILLEUX F., DEMAILLE J.G., 1983. Isolation of cardiac membrane proteolipids by high pressure liquid chromatography : a comparison of reticular and sarcolemmal proteolipids phospholamban and calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta.* 728 : 83 - 91.
- CARONI P., CARAFOLI E., 1981. Regulation of Ca (++) pumping ATPase of heart sarcolemma by a phosphorylation - dephosphorylation process. *J. Biol. Chem.* 256 : 9371 - 9373.
- CARONI P., CARAFOLI E., 1983. The regulation of the Na (+) - Ca (++) exchanger of heart sarcolemma. *Eur. J. Biochem.* 132 : 451 - 460.
- CASWELL A.H., BAKER S. P., BOYD H., POTTER L. T., GARCIA M., 1978. β adrenergic receptor and adenylate cyclase in transverse tubules of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 253 : 3049 - 3054.
- CAVADORE J.C., LE PEUCH J., WALSH M.P., VALLET B., MOLLA A., DEMAILLE J.G., 1981. Calcium calmodulin dependant phosphorylations in the control of muscular contraction. *Biochimie.* 63 : 301 - 306.
- CHIESI M., CARAFOLI E., 1982. The regulation of Ca (++) transport by fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Role of calmodulin and of the 53 000 D glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 257 : 984 - 991.
- COHEN P., 1980. Recently discovered systems of enzyme regulation by reversible phosphorylation. Elsevier - New York.

- DEMAILLE J.G., PECHERE J.F., 1983. The control of contractility by protein phosphorylation. Adv. cycl. Nucl. Prot. Phosphoryl. Res. 15 : 337 - 371.

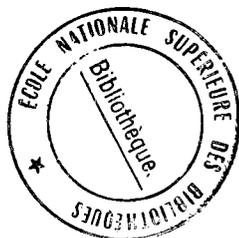
- FABIATO A., FABIATO F., 1979. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol. 41 : 473 - 484.
- HAIECH J., DEMAILLE J.G., 1983. Phosphorylation and the control of calcium fluxes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B302 : 91 - 98.
- HINDS T.R., ANDREASEN T.J., 1981. Photochemical cross-linking of azido calmodulin to the (Ca (++) - Mg (++)) ATPase of the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 256 : 7877 - 7882.
- KARSANOV N.V., KHUGASHVILI Z.G., 1983. Effect of calmodulin and 3' 5' AMP dependante Protein Kinase on calcium transport by reticulum sarcoplasmic of normal rabbit myocardium and in toxico-allergic myocarditis. Biokhimiia. 48 : 1359 - 1364.
- KASER-GLANZMANN R., GERBER E., LUSCHER E.F., 1979. Regulation of the intracellular calcium level in human blood platelets : cyclic adenosine 3' 5' monophosphate dependant phosphorylation of a 22 000 Dalton component in isolated Ca (++) accumulating vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 558 : 344 - 347.
- KIRSHBERGER M.A., ANTONETZ T., 1982. Calmodulin mediated regulation of calcium transport and (Ca (++) - Mg (++)) activated ATPase activity in isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 257 : 5685 - 5691.
- KIRSHBERGER M.A., TADA H., 1976. Effects of adenosine 3' 5' monophosphate dependant protein Kinase on sarcoplasmic reticulum isolated from cardiac and slow and fast contracting skeletal muscles. J. Biol. Chem. 251 : 725 - 729.
- KIRSHBERGER M.A., WRONG D., 1978. Calcium efflux from isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 253 : 6941 - 6945.
- KRANIAS E.G., BICK R., SCHWARTZ A., 1980. Phosphorylation of a 100 000 Dalton component and its relationship to calcium transport in sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta. 623 : 438 - 450.

- KRANIAS E.G., MANDEL F., WRANG T., SCHWARTZ A., 1980. Mechanism of the stimulation of calcium in dependant adenosine triphosphatase of cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3' 5' monophosphate dependant Protein Kinase. *Biochemistry*. 19 : 5434 - 5439.
- KRANIAS E.G., SAMAHA F.J., SCHWARTZ A., 1983. Mechanism of the stimulation of Ca (++) dependant ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by Protein Kinase. *Biochim. Biophys. Acta*. 731 : 79 - 87.
- KRANIAS E.G., SCHWARTZ A., JUNGSMANN R.A., 1982. Characterization of cyclic 3' 5' AMP dependant Protein Kinase in reticulum sarcoplasmic and cytosol of canine myocardium. *Biochim. Biophys. Acta*. 709 : 28 - 37.
- LAMERS J.M., STINIS J.T., 1980. Phosphorylation of low molecular weight proteins in purified preparations of rat heart sarcolemma and sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*. 624 : 443 - 459.
- LAMERS J.M., STINIS J.T., DE JONGE H.G., 1981. On the role of cyclic AMP and Ca (++)-calmodulin-dependant phosphorylation in the control of (Ca (++)-Mg (++)) ATPase of cardiac sarcolemma. *FEBS. Lett.* 127 : 139 - 143.
- LE PEUCH C.J., HAIECH J., DEMAILLE J.G., 1979. Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependant and calcium calmodulin dependant phosphorylations. *Biochemistry*. 18 : 5150 - 5157.
- LE PEUCH C.J., LE PEUCH D. A.M., KATZ S., DEMAILLE J.G., HINCKE M.T., BREDOUX R., ENOUF J., LEVY TOLEDAWOS., CAEN J., 1983. Regulation of calcium accumulation and efflux from platelet vesicles. Possible role for cyclic AMP dependant phosphorylation and calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta*. 731 : 456 - 464.
- LIMAS C.J., 1980. Phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum by a calcium activited phospholipid dependant Protein Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 : 1378 - 1383.

- LINDEMANN J.P., JONES L.R., HATHAWAY D.R., HENRY B.G., WATANABE A.M., 1983. β adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca (++) - ATPase activity in Guinea Pig ventricles. *J. Biolchem.* 258 : 464 - 471
- LOPASCHUK G., RICHTER B., KATZ S., 1980. Characterization of calmodulin effects on Ca (++) transport in cardiac microsomes enriched in reticulum sarcoplasmic. *Biochemistry.* 19 : 5603 - 5607.
- LOUIS C.F., MAFFITT W., 1982. Characterization of calmodulin mediated phosphorylation of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Archs. Biochem. Biophys.* 218 : 109 - 118.
- LORD S., RICHARDS F.M., 1981. The labeling with 8 azido-cyclic adenosine monophosphate of proteins in vesicles of reticulum sarcoplasmique from rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 649 : 12 - 23.
- MICHALAK M., CAMPBELL K.P., MAC LENNAN D.H., 1980. Localisation of the high affinity calcium binding protein and an intrinsic glycoprotein in reticulum sarcoplasmic membranes. *J. Biol. Chem.* 255 : 1317 - 1326.
- PLANK B., PIFL C., HELLMANN G., WYSKOVSKY W., HOFFMANN R., SUKO J., 1983. Correlation between calmodulin dependant increase in the rate of calcium transport and calmodulin dependant phosphorylation of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* 136 : 215 - 221.
- PLANK B., WYSKOUSKY W., HELLMANN G., SUKO J., 1983. Calmodulin dependant elevation of Ca (++) transport associated with calmodulin dependant phosphorylation in reticulum sarcoplasmic cardiac. *Biochim. Biophys. Acta.* 732 : 99 - 109.
- PHILIPSON K.D., NISHIMOTO A.Y., 1981. Efflux of Ca (++) from cardiac sarcolemmal vesicles. Influence of external Ca (++) and Na (+). *J. Biol. Chem.* 256 : 3698 - 3702.
- RINALDI M.L., CAPONY J.P., DEMAILLE J.G., 1982. The cyclic AMP dependant modulation of cardiac sarcolemmal slow calcium channels. *J. Molec. Cell. Cardiol.* 14 : 279 - 289.
- RINALDI M.L., LE PEUCH C.J., DEMAILLE J.G., 1981. The epinephrine induced activation of the cardiac slow Ca (++) channel is mediated by the cAMP dependant phosphorylation of calmodulin. A 23 000 M sarcolemmal protein. *FEBS. Lett.* 129 : 277 - 281.

- SARKADI B., ENYEDI A., SZASZ I., GARDOS G., 1982. Active calcium transport and calcium dependant membrane phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes. *Cell. calcium.* 3 : 163 - 182.
-
- ST LOUIS J.P., SULAKHE P.V., 1979. Phosphorylation of cardiac sarcolemma by endogenous and exogenous Protein Kinase. *Archs. Biochem. Biophys.* 198 : 227 - 240.
- TADA M., INUI M., 1983. Regulation of Ca (++) transport by the ATPase phospholamban system. *J. Mol. Cell. cardiol.* 15 : 565 - 575.
- TADA M., INUI M., YAMADA M., KADOMA M., KIZUYA T., ABE H., KAKIUCHIS., 1983. Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3' 5' monophosphate and calmodulin dependant Protein Kinase on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell. cardiol.* 15 : 335 - 346.
- TADA M., KATZA M., 1982. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu. Rev. Physiol.* 44 : 401 - 423.
- TADA M., OHMORI F., KINOSHITA N., ABE H., 1978. Cyclic AMP regulation of active calcium transport across membranes of sarcoplasmic reticulum. Role of the 22 000 Dalton protein phospholamban. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* 9 : 355 - 369.
- TADA M., YAMADA M., KADOMA M., INUI M., OHMORI F., 1982. Calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum and phosphorylation of phospholamban. *Molec. Cell. Biochem.* 46 : 73 - 95.
- TADA M., YAMADA M., OHMORI F., KUZUYA T., INUI M., ABE H., 1980. Transient state kinetic studies of Ca (++) dependant ATPase and calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255 : 1985 - 1992.
- TADA M., YAMAMOTO T., TONOMURA Y., 1978. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 58 : 1 - 79.
- TAKAI Y., KISHIMOTO A., IWASA Y., KAWAHAMA Y., MORI T., NISHIZURA Y., 1979. Calcium dependant activation of a multi-fonctionnal Protein Kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254 : 3692 - 3695.

- VARSANYI M., HEILMEYER L.M.G., 1981. Phosphorylation of the 100 000 M Ca (++) transport ATPase by Ca (++) or cyclic AMP dependant and independant Protein Kinase. FEBS. Lett. 131 : 223 - 228.
- VARSANYI M., TOLLE H.G., HEILMEYER L.M.G., DAUSON R.M.C., IRVINE R.F., 1983. Activation of sarcoplasmic reticulum Ca (++) transport ATPase by phosphorylation of an associated phosphatidylinositol. The EMBO JOURNAL. 2 : 1543 - 1548.
- VELEMA J., BOLT G.R., ZAAGSMA J., 1983. Cyclic AMP induced stimulation and inhibition of Ca (++) uptake in rat cardiac sarcolemma vesicles. Biochem. Pharmacol. 32 : 714 - 717.
- WELLER M., 1979. Protein phosphorylation. The nature function and metabolism of proteins which contain covalently bound phosphorus. Pion Limited 207 Brondesbury Park London.
- WETTER R., HAASE H., WILL H., 1982. Potentiating effect of calmodulin and catalytic subunit of cyclic AMP dependant Protein Kinase on ATP dependant Ca (++) transport by cardiac sarcolemma. FEBS. Lett . 148 : 326 - 330.
- WILL H., 1983. Early presence of phospholamban in developing a chick heart. FEBS. Lett. 155 : 326 - 330.
- WRENN R.W., KATOH N., WISE B.C., KUO J.F., 1980. Stimulation by phosphatidylserine and calmodulin of calcium dependant phosphorylation of endogenous proteins from cerebral cortex. J. Biol. Chem. 24 : 12042 - 12046.
- WUTHRICH C., STECK A.J., 1981. A permeability change of myelin membrane vesicles towards cations is induced by Mg ATP but not by phosphorylation of myelin basic protein. Biochim. Biophys. Acta. 640 : 195 - 206.





951144B