

Université de Montréal

**Rôle du calcium dans les voies de signalisation cellulaire de
l'insuline dans le foie:
Interaction avec les agents mobilisateurs de calcium**

Par

Kenza Benzeroual

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

**Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en pharmacologie**

Juin 1999

© Kenza Benzeroual



W
4
U58
2000
V.077

Université de Montréal

Rôle du calcium dans les voies de signalisation cytotoxique de
l'insuline dans le foie:
Interaction avec les agents modulateurs de calcium

Par

Kenza Benzeoual

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie Doctor (Ph. D.)
en pharmacologie

Juin 1999

© Kenza Benzeoual



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle du calcium dans les voies de signalisation cellulaire de
l'insuline dans le foie:
Interaction avec les agents mobilisateurs de calcium

Présentée par Kenza Benzeroual

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Trang Hoang:	Présidente-rapporteuse
Dr Pierre Haddad:	Directeur de recherche
Dr Gérard van de Werve:	Codirecteur de recherche
Dr Louis-Eric Trudeau:	Membre interne
Dr André Marette:	Membre externe
Dr Mois Bendayan:	Représentant du doyen de la F.E.S

Thèse acceptée le: 23 Novembre 1999

Never Give up on your dreams

Rick Hansen

SOMMAIRE

L'insuline est une hormone anabolique produite par le pancréas suite à une élévation du taux sérique de glucose et d'acides aminés. Elle agit principalement sur le foie, le muscle lisse et le tissu adipeux pour promouvoir l'emmagasinage et l'utilisation du glucose. D'autre part, une bonne partie des effets de l'insuline sur le foie consiste également à antagoniser les effets des hormones cataboliques tels que le glucagon et les agents mobilisateurs de calcium. Des études préalables ont démontré que l'insuline inhibe l'activation de la phosphorylase et diminue l'augmentation du calcium intracellulaire induit par les agents mobilisateurs de calcium. Par ailleurs, plusieurs travaux impliquent les ions calciques dans l'action de l'insuline sur divers types cellulaires, même si ce sujet demeure controversé. Au niveau du foie, le rôle du calcium dans l'action de l'insuline n'a pas été bien étudié. Dans la présente étude nous avons d'abord testé, dans les hépatocytes isolés de rat, l'effet direct de l'insuline sur le calcium intracellulaire et les voies de signalisation affectées par ce second messager. Nous avons ensuite étudié le rôle de cet ion dans l'effet interactif de l'insuline avec les agents mobilisateurs de calcium.

Nous avons observé que l'insuline cause une élévation significative du calcium cytosolique chez les doublets d'hépatocytes isolés de rat et mis en culture à court terme. Cette augmentation se fait de manière dose-dépendante et la réponse calcique à l'insuline est généralement monophasique et transitoire, comparée à celle de la phényléphrine qui est biphasique et généralement soutenue pour toute la durée de l'administration. Nous avons déduit que l'insuline et la phényléphrine modulent l'homéostasie du calcium hépatocellulaire par des mécanismes différents. Lorsque le calcium extracellulaire est chélaté par l'EGTA, la réponse calcique induite par l'insuline disparaît alors que celle à la phényléphrine est réduite à un simple pic transitoire dû à la mobilisation de calcium à partir des réserves intracellulaires sensibles à l'IP₃. Des études

de liaison ont confirmé que la chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA n'affecte pas la liaison de l'insuline à son récepteur. Nous expliquons ces observations par une stimulation de l'influx de calcium par l'insuline sans effet de l'hormone sur les réserves intracellulaires.

Dans cette étude, le profil pharmacologique de l'influx de calcium induit par l'insuline a été déterminé à l'aide de bloqueurs de canaux calciques. Le vérapamil n'inhibe pas la réponse calcique à l'insuline. Nous expliquons cette observation par l'absence de canaux calciques voltage-dépendants sur ces cellules. D'autre part, le nickel et le gadolinium inhibent fortement l'influx de calcium induit par l'insuline. Conjointement aux résultats obtenus avec l'EGTA et le vérapamil, ce profil pharmacologique est compatible avec l'implication des canaux cationiques non sélectifs (CCNS) dans l'influx de calcium induit par l'insuline. En effet, ces canaux ont été décrits sur les cultures primaires d'hépatocytes de rat et sur les cellules HTC (hepatome de rat). Ils sont insensibles au vérapamil mais sont bloqués par le nickel et le gadolinium.

Étant donné la diversité des mécanismes d'action de l'insuline, nous avons étudié l'effet de cet influx calcique sur les différentes voies de signalisation. Nous avons trouvé que les conditions expérimentales qui interfèrent avec l'influx de calcium induit par l'insuline (EGTA, nickel et gadolinium) inhibent l'activité MAPK et celle de la PI3-K. Par contre la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 n'est pas affectée dans ces conditions. L'influx de calcium induit par l'insuline intervient peut être dans la cascade de signalisation en aval de l'IRS-1.

Étant donné que l'insuline antagonise les effets des hormones cataboliques, nous avons étudié l'implication de l'influx de calcium dans l'effet interactif entre l'insuline et les agents mobilisateurs de calcium sur des cellules HTC. Nos études montrent que l'insuline inhibe la dépolarisation rapide causée par l'ATP. En effet, cette dépolarisation rapide est reliée à l'activation des CCNS. Des études en fluorescence appuient l'hypothèse que ceci est dû à un antagonisme au niveau de l'influx plutôt qu'à un effet sur la mobilisation de calcium à partir des réserves intracellulaires en réponse à l'ATP.

Ces effets antagonistes sont peut être médiés par un mécanisme commun, soit l'activation de la PKC par l'insuline. En effet, il a été montré au préalable que les CCNS sont inhibés par la PKC. Dans un protocole de retrait et de ré-admission de calcium extracellulaire, l'insuline diminue la vitesse initiale d'entrée de calcium induite par la vidange des réserves intracellulaires après stimulation par l'ATP exogène mais non après celle causée par la thapsigargine. Cet antagonisme par l'insuline de la réponse calcique à l'agoniste purinergique ATP se reflète par une diminution de la phosphorylation de la MAPK.

En conclusion, le calcium joue un rôle important dans la cascade de signalisation de l'insuline chez les hépatocytes. Par contre, d'autres effets, dont possiblement l'augmentation de l'activité PKC, font que l'insuline puisse aussi antagoniser l'action des hormones mobilisant le calcium au niveau du foie.

Table des matières

	Page	
Sommaire		III
Liste des tableaux		VII
Liste des figures		VIII
Liste des abréviations		X
Dédicace		XII
Remerciements		XIII
Chapitre I : Les voies de signalisation cellulaire de l'insuline		1
1.1 Introduction		1
1.2 Mécanisme d'action de l'insuline		3
1.2.1 Le récepteur à l'insuline : mécanisme d'action et de transmission du signal		3
1.2.2 Les substrats de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline		8
a) L'insulin receptor substrate-1		8
b) L'insulin receptor substrate-2		10
c) Les substrats non IRS		13
1.2.3 La cascade phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K)		13
a) La voie d'activation de la PI3-K		14
b) La p70 ^{S6k} , la PKB et la PDK-1 : mécanismes d'activation		18
c) La glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)		19
d) Rôle de la PI3-K dans l'action de l'insuline		21
1.2.4 La cascade mitogen-activated protein kinase(MAPK)		22
a) La voie Ras/Raf/MAPK et sa régulation		23
b) Le rôle de la MAPK dans l'action de l'insuline		25
1.2.5 Rôle des phosphatases dans l'action de l'insuline		28
1.2.6 Insuline et protéines G		29
1.2.7 Seconds messagers putatifs de l'insuline		31

a) L'inositol-phosphoglycan	31
b) Le diacylglycérol	32
Chapitre II : Le rôle du calcium dans l'action de l'insuline	33
2.1 L'effet de l'insuline sur le calcium intracellulaire dans divers types cellulaires	33
2.2 Effet du calcium sur les différentes réponses physiologiques de l'insuline	35
2.3 Résistance à l'insuline et calcium	36
Chapitre III : Les agents mobilisateurs de calcium	39
3.1 Mécanisme d'activation de la PLC β par les RCPG	41
3.1 Homéostasie du calcium intracellulaire	42
a) Mobilisation du calcium séquestré	43
b) Mécanisme régissant l'influx de calcium	45
c) Les voies d'entrée du calcium dans les cellules hépatiques	48
3.2 Mécanisme d'activation, de régulation et d'action de la protéine kinase C (PKC)	50
a) Activation de la PKC	51
b) Mécanismes de désensibilisation de la PKC	52
3.4 Activation de la MAPK par les agents mobilisateurs de calcium	56
Chapitre IV : Approche et but du travail	61
Chapitre V : Articles	67
5.1 Article 1: <i>Insulin induces Ca²⁺ influx into isolated rat hepatocyte couplets</i>	69
5.2 Article 2: <i>Insulin induces Ca²⁺ entry into hepatocytes is important</i>	110

for PI3-Kinase activation but not for IR β -subunit and IRS-1 tyrosine phosphorylation

5.3 Article 3: <i>Interaction between the effect of insulin and calcium mobilizing agonist ATP in rat HTC liver cell line</i>	141
Chapitre VI : Discussion	174
5.1 Effet de l'insuline sur le calcium hépatocellulaire	174
5.1.1 Effet propre de l'insuline sur le calcium hépatocellulaire	174
5.1.2 Détermination du profil pharmacologique de l'influx de calcium stimulé par l'insuline	177
5.1.3 Le rôle de l'influx de calcium dans les voies de signalisation cellulaire de l'insuline	179
a) La voie MAPK	179
b) La voie PI3-K	181
a) Effet du calcium sur la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1	182
5.2 Interaction entre l'insuline et les agents mobilisateurs de calcium	183
5.2.1 Interaction au niveau membranaire	184
a) Rôle de la PKC dans les effets antagonistes de l'insuline envers les Mobilisateurs de calcium	186
5.2.2 Interaction au niveau intracellulaire	189
5.1 Conclusion et perspectives	
5.3.1 Effet direct de l'insuline	192
5.3.2 Effet interactif de l'insuline	194
Références	196

Liste des tableaux

	Page
Tableau I: Les principales actions de l'insuline dans le foie (F), le tissu adipeux (A) et le muscle (M)	2

Tableaux dans les articles**Article 1:**

Tableau 1: Effects of Ca ²⁺ channel inhibitors on insulin-induced Ca ²⁺ response	97
---	----

Article 3:

Tableau I: Direct and interactive effects of 10 nM insulin on the initial Ca ²⁺ influx rate observed upon re-admission of external Ca ²⁺ after a period of Ca ²⁺ -free perfusion	168
--	-----

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Structure du récepteur à l'insuline	5
Figure 2 : Mécanisme par lequel le récepteur à l'insuline transmet le message aux protéines SH2	7
Figure 3 : Structure schématique d'un domaine SH2 interagissant avec le motif YMXM de l'IRS-1	11
Figure 4 : Liaison des protéines effectrices à l'IRS-1/2 et à Shc	12
Figure 5 : Mécanismes de transduction du signal par la voie PI3-K	16
Figure 6 : Les principales voies de transmission du signal de l'insuline	20
Figure 7 : Stimulation de la phospholipase C β par les récepteurs couplés à Gq	40
Figure 8 : Le modèle d'entrée capacitative de calcium et l'action du Cif	46
Figure 9 : Mécanismes d'activation de la PKC	53
Figure 10 : Mécanisme proposé pour l'effet interactif de l'insuline avec les agonistes mobilisateurs de calcium	188

Figures dans les articles

Article 1:		Page
Figure 1:	Representative responses of intracellular Ca ²⁺ to phenylephrine and insulin in isolated rat hepatocyte couplets	99
Figure 2:	Dose-response curve for insulin-induced rise in Hepatocellular Ca ²⁺	101
Figure 3:	Effect of external Ca ²⁺ chelation on insulin- and phenylephrine-induced changes in intracellular Ca ²⁺ in rat hepatocyte couplets	103
Figure 4:	Effect of external Ca ²⁺ chelation on displacement of ¹²⁵ I-labeled insulin by unlabeled ligand	105
Figure 5:	Effects of external Ca ²⁺ chelation and Ca ²⁺ channel inhibitors on insulin-induced activation of p44 ^{mapk}	107
 Article 2:		
Figure 1:	Time-course of stimulation of PI 3-kinase activity by Insulin	134
Figure 2:	Dose-dependent effect of insulin on PI 3-kinase activity	135
Figure 3:	Effect of extracellular calcium chelation (EGTA) and of Calcium channel blockers on insulin-induced PI 3-kinase activity	136
Figure 4:	Effects of external Ca ²⁺ chelation and of Ca ²⁺ channel inhibitors on insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation	137
Figure 5:	Effects of external Ca ²⁺ chelation and of Ca ²⁺ channel inhibitors on insulin induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor	138

Article 3:

Figure 1:	Effect of 10 nM insulin on membrane potential changes induced by ATP in HTC cells	169
Figure 2:	Effect of insulin on ATP-induced Ca^{2+} response in HTC cells	170
Figure 3:	Insulin induces concentration-dependent p44/42 MAPK Phosphorylation	171
Figure 4:	Effect of EGTA on insulin and ATP-induced p44/42 MAPK phosphorylation	172
Figure 5:	Effect of insulin on ATP-induced p44/42 MAPK phosphorylation in HTC cells	173

Liste des abréviations

AMPC:	AMP cyclique
CCNS :	canaux cationiques non sélectifs
DAG:	1,2 Diacylglycérol
EGF:	Facteur de croissance épidermique
EGTA:	Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERK:	Extracellular signal regulated kinase
GS :	Glycogène synthase
GSK-3 :	Glycogène synthase kinase-3
G6P	Glucose 6 phosphate
Grb2 :	Growth factor-receptor binding protein
IRS-1/2:	Insulin receptor substrate-1/2

IP ₃ :	Inositol-1,4,5-trisphosphate
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MEK:	MAPK kinase
PDGF:	Facteur de croissance dérivé de plaquettes
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PDK-1 :	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PH :	Pleckstrin homology domain
PKA:	Protéine kinase A
PKB :	protéine kinase B
PKC:	protéine kinase C
PLC:	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PP1G:	Protéine phosphatase de type 1 associée au Glycogène
PTB :	Phosphotyrosine binding domain
RCPG:	Récepteur couplé aux protéines G
RTK :	Récepteur tyrosine kinase
RE:	Reticulum endoplasmique
SH2 :	Src homology domain
SHPTP-2 :	Phosphotyrosine phosphatase

Dédicace

**À mon mari,
Pour ton amour, ta passion et ta compréhension,
ton support m'a permis de surmonter des moments difficiles**

**À mes parents,
Les mots sont incapables d'exprimer ma reconnaissance
pour tout le soutien et l'encouragement
que vous m'avez toujours donné**

**À mon frère et à mes soeurs,
Merci d'être vous**

**À mes ami(e)s
Pour votre support et votre écoute**

À mon fils

Remerciements

Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance envers le Prof Pierre Haddad qui m'a donné la chance de découvrir les joies et les peines de la recherche. Ses connaissances et son inspiration ont su me guider dans ma formation scientifique. Son enthousiasme, sa patience et sa compréhension ont rendu l'expérience agréable. Je le remercie sincèrement du temps précieux qu'il m'a consacré.

Je tiens également à remercier le Prof Gérard van de Werve qui a accepté de superviser ma formation en tant que codirecteur. Sa connaissance profonde de la matière et ses conseils pertinents m'ont permis d'appivoiser une autre facette de la recherche.

Je remercie aussi le Dr. Ashok K. Srivastava et le Dr. Sylvain Meloche de m'avoir donné la chance de réaliser une partie de mon projet de recherche dans leur laboratoire et merci aussi pour le temps que vous m'avez consacré.

Au Dr. Sanjay K. Pandey, merci de m'avoir aidé à réaliser certains projets et merci pour ton support moral. Bonne chance et beaucoup de succès dans ton avenir.

De plus, je tiens à remercier Diane Vallerand, Lucie Héroux et Edith Giasson pour leur support technique.

À M. Elisabeth Pérès, spécialiste en infographie. Merci d'avoir contribué à réaliser cette thèse.

Enfin je remercie mes collègues, pour leur support, leur écoute et surtout pour avoir été de bons amis.

I - LES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE DE L'INSULINE

1.1- INTRODUCTION

L'insuline est une hormone anabolique hypoglycémisante produite par les cellules β du pancréas suite à une élévation du taux sérique de glucose et d'acide aminés. Chez les mammifères, elle joue un rôle primordial dans le contrôle de la glycémie. Ses actions biologiques sont nombreuses, elle stimule la lipogénèse, la synthèse de protéines et d'ADN et contrôle la transcription de certains gènes et la traduction d'ARNm (Gingras et Donzé, 1995). De plus, elle favorise l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (le muscle et le tissu adipeux) et son emmagasinage sous forme de glycogène et inhibe la néoglucogénèse dans le foie et la lipolyse dans les adipocytes (tableau I). Une bonne partie des effets de l'insuline consiste également dans l'antagonisme des effets du glucagon et des effets β -adrénergiques catécholamines ainsi que ceux des agents mobilisateurs de calcium au niveau de la glycogénolyse dans le foie (Thomas et Williamson, 1983; Thomas et al., 1985). Dans du foie, très peu est connu sur le mode d'action de cette hormone, du fait que les effets propres de l'insuline sont difficiles à détecter dans les hépatocytes. Bien que les effets physiologiques de l'insuline soient bien documentés, son mécanisme d'action n'est toujours pas complètement élucidé à cause de la multiplicité des voies de signalisation impliquées dans l'action de cette hormone et qui seront discutées en détail dans les sections à venir.

Tableau I			
LES PRINCIPALES ACTIONS DE L'INSULINE DANS LE FOIE (F), LE TISSU ADIPEUX (A) ET LE MUSCLE (M).			
Actions	Effet	Tissu	Site de régulation**
Transport de glucose	+	A, M	Transporteurs de glucose : translocation
Synthèse de glycogène	+	F, A, M	Glycogène synthase : déphosphorylation
Glycogénolyse	-	F, A, M	Phosphorylase kinase : déphosphorylation
Glycolyse/gluconéogenèse	+/-*	F	Fructose 2,6-bisphosphate et pyruvate kinase : déphosphorylation
Pyruvate → acide gras	+	F, A	Pyruvate déshydrogénase : déphosphorylation acétylCoA carboxylase : phosphorylation
Lipolyse (triglycérides)	-*	A	Triacylglycérol lipase : déphosphorylation
Synthèse de protéines	+	F, A, M	Début de la transcription
Synthèse d'ARNm	+ et -	F, A, M	Transcription

* Signifie qu'il s'agit d'une action visible après élévation du taux intracellulaire d'AMPC par une autre hormone.

** Les sites indiqués ne sont pas exhaustifs, mais présentés à titre d'exemple.

(Pinget et Roques, 1996)

1.2- MÉCANISMES D'ACTION DE L'INSULINE

Pour exercer ses fonctions, l'insuline doit se lier à son récepteur membranaire, qui est présent dans le foie, le muscle et le tissu adipeux, avec un degré de spécificité élevé mais pas exclusif. Le récepteur se retrouve dans d'autres cellules mais en plus faible quantité. Ce récepteur transmet ensuite le signal à travers la membrane et déclenche une cascade d'événements qui vont modifier l'état de phosphorylation d'enzymes du métabolisme. Certaines enzymes seront phosphorylées par des kinases, alors que d'autres seront déphosphorylées sous l'action de phosphatases résultant soit en une activation soit en une inactivation (Denton et Tavaré, 1995). Étant donné l'immensité et la complexité des études dont fait l'objet le mécanisme d'action de l'insuline, la discussion qui suit est un résumé compréhensif de la littérature qui est limité aux voies de signalisation cellulaire de l'insuline dans un contexte métabolique. Je vais donc d'abord décrire les différentes voies de signalisation impliquées dans l'action de cette hormone ainsi que leur régulation et, dans le chapitre II, traiter du rôle du calcium dans l'action de l'insuline.

1.2.1- Le récepteur à l'insuline: mécanisme d'action et de transmission du signal

Le récepteur à l'insuline fait partie de la famille des récepteurs possédant une activité tyrosine kinase. Cette classe de récepteurs-enzymes répond à la liaison du ligand en catalysant le transfert du groupe γ -phosphate de l'ATP sur des résidus tyrosines des protéines. Dans le cas du récepteur à l'insuline, la phosphorylation des

tyrosines se fait sur le récepteur lui-même (autophosphorylation) et sur divers substrats intracellulaires. Le récepteur est une glycoprotéine transmembranaire avec un poids moléculaire de 460 kDa (Massague et al., 1980; Kasuga et al., 1982). Il consiste en deux sous-unités α (130 kDa) et deux sous-unités β (95 kDa). Les sous-unités α et β sont codées par un seul gène. Chez l'humain, le récepteur à l'insuline est localisé sur le bras court du chromosome 19 (Yang-Feng et al., 1985). Les sous-unités α et β sont liées par des ponts disulfures pour former un tétramère avec une structure β - α - α - β (Czech, 1985, 1989; Avruch, 1989). Les sous-unités α sont extracellulaires et comportent les domaines de liaison de l'insuline. Les sous-unités β présentent un domaine extracellulaire, un segment transmembranaire et une région intracellulaire (figure 1).

L'activité tyrosine kinase du récepteur est portée par la partie cytoplasmique de la sous-unité β , qui est elle-même subdivisée en trois domaines fonctionnels. Le **domaine juxta-membranaire** est impliqué dans la reconnaissance d'effecteurs intracellulaires, où se situe la tyrosine 960 (appartenant au motif NPXY: Asn-Pro-X-Tyr, ou X représente n'importe quel acide-aminé). La substitution de la tyrosine 960 entraîne une perte des effets biologiques *in vivo* incluant la synthèse de glycogène et celle de l'ADN (White et al., 1988a; Murakami et Rosen, 1991). Dans ce cas, le récepteur mutant ne phosphoryle plus ses substrats: l'"Insulin Receptor Substrate-1" (**IRS-1**) et "Src Homology / collagen" (**Shc**).

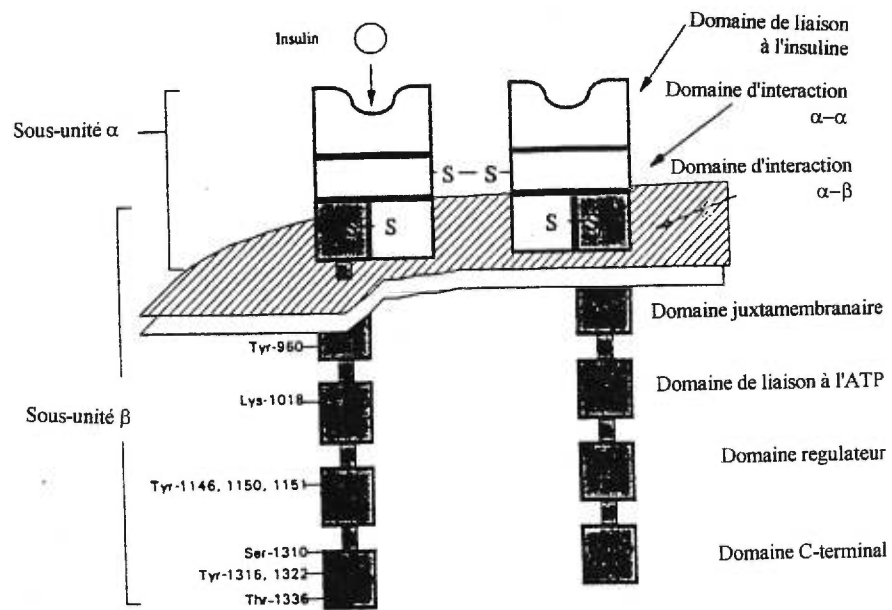


Figure 1. Structure du récepteur à l'insuline. (Kahn et al., 1993)

Des études récentes suggèrent que le motif NPXY phosphorylé se lie au domaine "phosphotyrosine binding" (**PTB**) des protéines IRS et Shc (Sun et al., 1995; Wolf et al., 1995) (figure 2). Les récepteurs de facteur de croissance épidermique (**EGF**) et de facteur de croissance dérivé des plaquettes (**PDGF**) n'ont pas le motif NPXY et ne phosphorylent pas les protéines IRS (Myers et al., 1996). Le domaine juxtamembranaire est suivi du **domaine tyrosine kinase**, constitué d'un site de liaison de l'ATP qui est nécessaire au fonctionnement de la kinase et d'un groupe de trois tyrosines qui forment le site majeur d'autophosphorylation. Une fois ces tyrosines phosphorylées, l'activité du récepteur envers ses substrats est augmentée (White et al., 1985, 1988b). Les mutations qui affectent l'activité kinase du récepteur ou sa capacité de s'autophosphoryler dans la région régulatrice entraîne une perte de l'action de l'insuline (Chou et al., 1987; Ebina et al., 1987; Ellis et al., 1987). Ce domaine joue donc un rôle primordial dans la régulation de l'activité tyrosine kinase. Ces trois tyrosines forment aussi le site préférentiel de déphosphorylation du récepteur par les phosphotyrosines phosphatases cellulaires (King et Sale, 1990). Le **domaine carboxyterminal** comporte des sites d'autophosphorylation des résidus tyrosines, ainsi que des sérines et des thréonines phosphorylables (White et Kahn, 1994). L'importance fonctionnelle de cette dernière région est encore débattue.

Récepteur à l'insuline

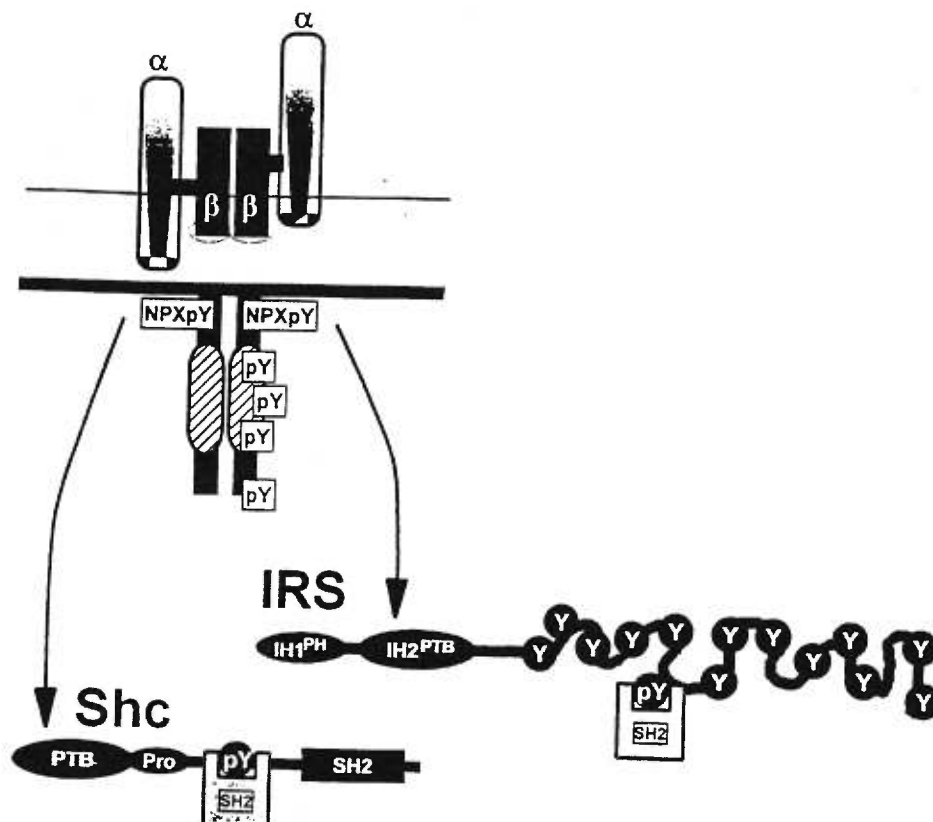


Figure 2. Mécanisme par lequel le récepteur à l'insuline transmet le message aux protéines SH2. L'insuline transmet le signal aux protéines SH2 à travers la liaison du motif NPXY phosphorylé au domaine PTB des protéines IRS et Shc. (White, 1997)

La liaison de l'insuline à son récepteur lève l'inhibition exercée par la sous-unité α inoccupée sur la sous-unité β , probablement en induisant de nombreux changements conformationnels, aussi bien dans la sous-unité α que β (Baron et al., 1990). En réponse, le récepteur s'autophosphoryle sur les résidus tyrosines des différents domaines cités plus-haut. L'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase permet l'activation maximale de l'enzyme et la rend indépendante de la présence d'insuline. La phosphorylation des résidus sérines et thréonines du domaine carboxyterminal pourrait constituer un des systèmes de régulation de l'activité enzymatique en diminuant ainsi l'activité tyrosine-kinase du récepteur.

1.2.2- Les substrats de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline

Le mécanisme par lequel l'insuline règle le métabolisme et stimule la croissance cellulaire a été intensivement étudié. La découverte des protéines IRS et leur phosphorylation par la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline a permis de comprendre et d'expliquer la diversité du système de signalisation de l'insuline. Cependant, le rôle des différents IRS dans le signal de l'insuline ainsi que le rôle des autres substrats de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline qui sont distincts des protéines IRS reste à éclaircir.

a) L'insulin receptor substrate-1

Un des substrats le mieux caractérisé de l'activité tyrosine kinase est l'IRS-1. C'est le substrat ubiquitaire et majeur du récepteur à l'insuline (Sun et al., 1991); il a été

originellement appelé pp185 basé sur sa migration durant SDS-PAGE (White et al., 1985). C'est une protéine cytosolique de 131 kDa, initialement détectée par immunoprécipitation avec des anticorps antiphosphotyrosines dans des cellules d'hépatomes FAO stimulées par l'insuline. L'IRS-1 possède des domaines fonctionnels impliqués dans sa reconnaissance par le récepteur, appelés domaine "pleckstrin homology" (**PH**) et domaine PTB (Myers et al., 1995; Eck et al., 1996) (figure 2). Elle contient aussi de nombreux sites de phosphorylation de tyrosines, dont 7 ou 8 sites seraient phosphorylés en réponse à l'insuline sur des motifs particuliers (Sun et al., 1991). De plus, l'IRS-1 présente une trentaine de sites de phosphorylation sur des résidus sérines et thréonines. Une fois phosphorylés, ces sites pourraient réguler négativement la phosphorylation sur les résidus tyrosines et, de ce fait, diminuer les possibilités pour l'IRS-1 d'interagir avec les effecteurs en aval (Tanti et al., 1994). Cette possibilité a été vérifiée de manière indirecte dans les adipocytes 3T3-L1 où l'acide okadaïque, un inhibiteur de sérine phosphatase, inhibe la phosphorylation de tyrosines stimulées par l'insuline (Jullien et al., 1993).

Contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, le récepteur à l'insuline n'interagit pas directement avec les molécules contenant des domaines "Src Homology region 2" (**SH2**). En effet, ce sont plutôt les tyrosines phosphorylées de l'IRS-1 qui interagissent fortement avec les domaines SH2 portés par certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation. Ces domaines sont des modules d'une centaine d'acides aminés, organisés en poche, qui reconnaissent une tyrosine phosphorylée lorsqu'elle est située dans une séquence particulière d'acides aminés

(Chardin, 1994) (figure 3). Par ces mécanismes, l'IRS-1 activé par l'insuline peut recruter des enzymes telles que la phosphatidylinositol-3-kinase (**PI3-K**) (Rodorf-Nikolic et al., 1995) et la phosphotyrosine phosphatase (**SHPTP-2**) (appelée aussi Syp) (Sugimoto et al., 1994; Xiao et al., 1994). La liaison de l'IRS-1 à ces protéines résulte dans la stimulation rapide de leur activité enzymatique (Myers et al., 1992; Folli et al., 1992). D'autres protéines SH2 qui n'ont pas d'activité enzymatique interagissent avec l'IRS-1 et servent comme protéines adaptatrices entre l'IRS-1 et les autres systèmes de signalisation. La mieux caractérisée est l'adaptateur "growth-factor-receptor binding protein" (**Grb2**) qui lie l'IRS-1 à la voie Ras (revu dans Myers et al., 1994; Rodorf-Nikolic et al., 1995) (figure 4). La manière exacte dont ces voies de signalisation intermédiaires sont impliquées dans l'action de l'insuline n'est pas entièrement connu.

b) L'insulin receptor substrate-2

Récemment, il a été montré que des souris déficientes dans le gène de l'IRS-1 ne présentent qu'un modeste retard de croissance et une légère insulino-résistance (Araki et al., 1994; Yamauchi et al., 1996). L'analyse de leur foie montre que l'insuline demeure capable d'activer la PI3-K. Ces résultats suggèrent que l'insuline peut agir via des substrats indépendants de l'IRS-1. Une protéine de 190 kDa semblable à l'IRS-1 fût en effet découverte et nommée "insulin receptor substrate-2" (**IRS-2**).

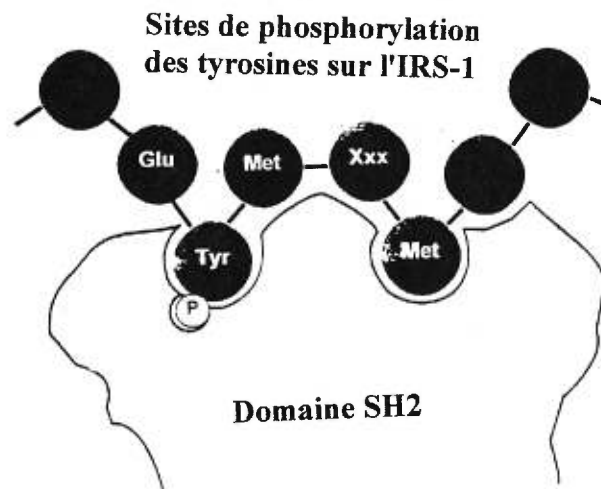


Figure 3. Structure schématique d'un domaine SH2 interagissant avec le motif YMXM de l'IRS-1. Le site majeur, conservé dans tous les domaines SH2, reconnaît la tyrosine phosphorylée, le deuxième site confère la spécificité de reconnaissance, ici une méthionine reconnue par le domaine SH2 de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase. Tyr; tyrosine, Met: méthionine, X: n'importe quel acide aminé. (Kahn, 1997)

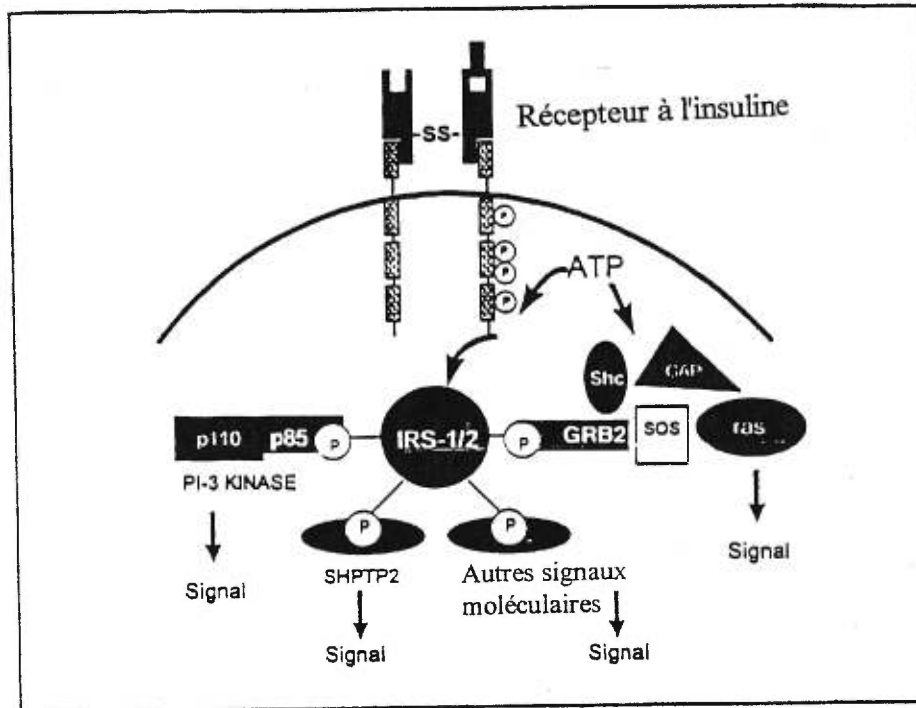


Figure 4. Liaison des protéines effectrices à l'IRS-1/2 et à Shc.
 En réponse à la stimulation du récepteur à l'insuline et à son activité tyrosine kinase, les protéines IRS-1/2 et Shc phosphorylées recrutent diverses protéines effectrices. (Goalston et Draznin, 1997).

Elle est phosphorylée sur des tyrosines en réponse à l'insuline et s'associe au domaine SH2 de PI3-K, SHPTP-2 et Grb2 (Waters et Pessin, 1996) (figure 4). Très récemment, Rother et al. (1998) ont montré que l'IRS-2 est le substrat principal du récepteur à l'insuline chez les hépatocytes. Suite à sa liaison à la PI3-K, il transmet les effets métaboliques et stimule la croissance cellulaire en réponse à l'insuline dans ces cellules.

c) Les substrats non IRS

En plus des protéines de type IRS, d'autres substrats ont été trouvés pour le récepteur à l'insuline. Shc est une protéine de 52 kDa, également phosphorylée sur des résidus tyrosines en réponse à l'insuline (Myers et al., 1994). Elle forme un complexe avec Grb2 qui est associé à la protéine "Son of sevenless" (Sos), augmentant ainsi l'activité d'une petite protéine G nommée Ras (Pelicci et al., 1992) (figure 4) et ce, en absence de phosphorylation de l'IRS-1/2. Par cette interaction, Shc joue un rôle dans l'activation de la cascade "mitogen-activated protein kinase" (MAPK) (Seger et al., 1995). D'un autre côté, l'insuline stimule la phosphorylation d'une ou de plusieurs protéines de poids moléculaire de 55-60 kDa (p55 et p60). Ces protéines interagissent avec la voie de signalisation de la PI3-K (Quon et al., 1994).

1.2.3- La cascade phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K)

Divers effets biologiques de l'insuline sont transmis par la voie de signalisation de la PI3-K. Cette enzyme joue un rôle important dans le transport de glucose, la

synthèse de glycogène ainsi que dans la régulation de la transcription de certains gènes. La PI3-K est la première protéine SH2 trouvée associée avec l'IRS-1 (Sun et al., 1991). Peu de PI3-K se trouve directement associé avec le récepteur à l'insuline contrairement à ce qui a été observé pour les autres récepteurs de facteurs de croissance portant une activité tyrosine kinase (Endemann et al., 1990). Ceci est expliqué par le fait que le récepteur de l'insuline ne contient pas de séquence consensus du type YMXM. À l'opposé, l'IRS-1 qui contient de nombreux motifs YMXM, est associé avec une activité PI3-K et pourrait donc servir d'intermédiaire entre le récepteur et la PI3-K.

a) La voie d'activation de la PI3-K

En réponse à l'insuline, la classe 1a de PI3-K est activée. Cette classe 1a existe sous forme d'hétérodimère qui consiste en une sous-unité régulatrice p85 présentant deux sites SH2 et liée à une sous-unité catalytique p110. La p85 a un domaine SH3 dont la fonction exacte est inconnue mais qui serait impliqué dans des interactions protéine-protéine (Skolnik et al., 1991). L'activation complète de la p110 résulte de changements conformationnels de la sous-unité p85 lorsque ses deux domaines SH2 sont engagés, comme c'est le cas avec l'IRS-1 (Rodorf-Nikolic et al., 1995). L'IRS-1 phosphorylé en réponse à l'insuline, s'associe avec la sous-unité p85 de la PI3-K, ce qui stimule l'activité de la sous-unité catalytique de 5 à 10 fois (Ruderman et al., 1990; Kapeller et al., 1991; Backer et al., 1991, 1992). Ceci résulte en la phosphorylation de phosphatidylinositol-4-phosphate (**PI-4-P**) et de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (**PI-4,5-P₂**), sur la position 3 pour former le

PI-3,4-P₂ et le **PI-3,4,5-P₃** (Ruderman et al., 1990; Endermann et al., 1990). Le rôle de ces différents produits n'est pas clairement déterminé. Les sites potentiels de ces seconds messagers incluent la "phosphoinositide-dependent protein kinase" (**PKC-1**) (Cohen et al., 1997; Alessi et al., 1998), la protéine kinase B (**PKB/Akt**) (Burgering et Coffèr., 1995; Franke et al., 1995, 1997) et certaines isoformes de la protéine kinase C (**PKC**) (Nakanishi et al., 1993; Toker et al., 1994; Toker et Cantley, 1997) (figure 5). Il a été rapporté que le PI-3,4,5-P₃ peut se lier et activer les formes de PKC dépendantes et indépendantes du calcium (Singh et al., 1993; Nakanishi et al., 1993). Le PI-3,4,5-P₃ et PI-3,4-P₂ se lie à l'isoforme zeta de PKC et l'active in vitro (Nakanishi et al., 1993; Standaert et al., 1997). Le mécanisme exact de cette activation n'est pas connu.

La voie PI3-K stimulée par l'insuline diffère de la voie classique des phosphatidylinositols dans laquelle le PI-4,5-P₂ (**PIP₂**) est clivé par la phospholipase C (**PLC**) en inositol-1,4,5-trisphosphate (**IP₃**) et en 1,2 diacylglycérol (**DAG**). Contrairement aux seconds messagers (**IP₃** et **DAG**) des récepteurs couplés aux protéines G (**RCPG**), le PI-3,4-P₂ et le PI-3,4,5-P₃ restent dans la membrane plasmique. La PI3-K peut aussi être cibler sur des organelles internes et pas seulement sur la membrane plasmique. Des études antérieures ont en effet démontré que l'insuline cible la PI3-K dans une organelle enrichi en GLUT4 (Heller-Harrison et al., 1996). Étant donné que le PI-3,4-P₂ et le PI-3,4,5-P₃ restent localisés dans la membrane, ceci suggère qu'une de leur fonction est d'attirer certains effecteurs aux sites spécifiques sur la membrane. Le PI-3,4,5-P₃ peut être

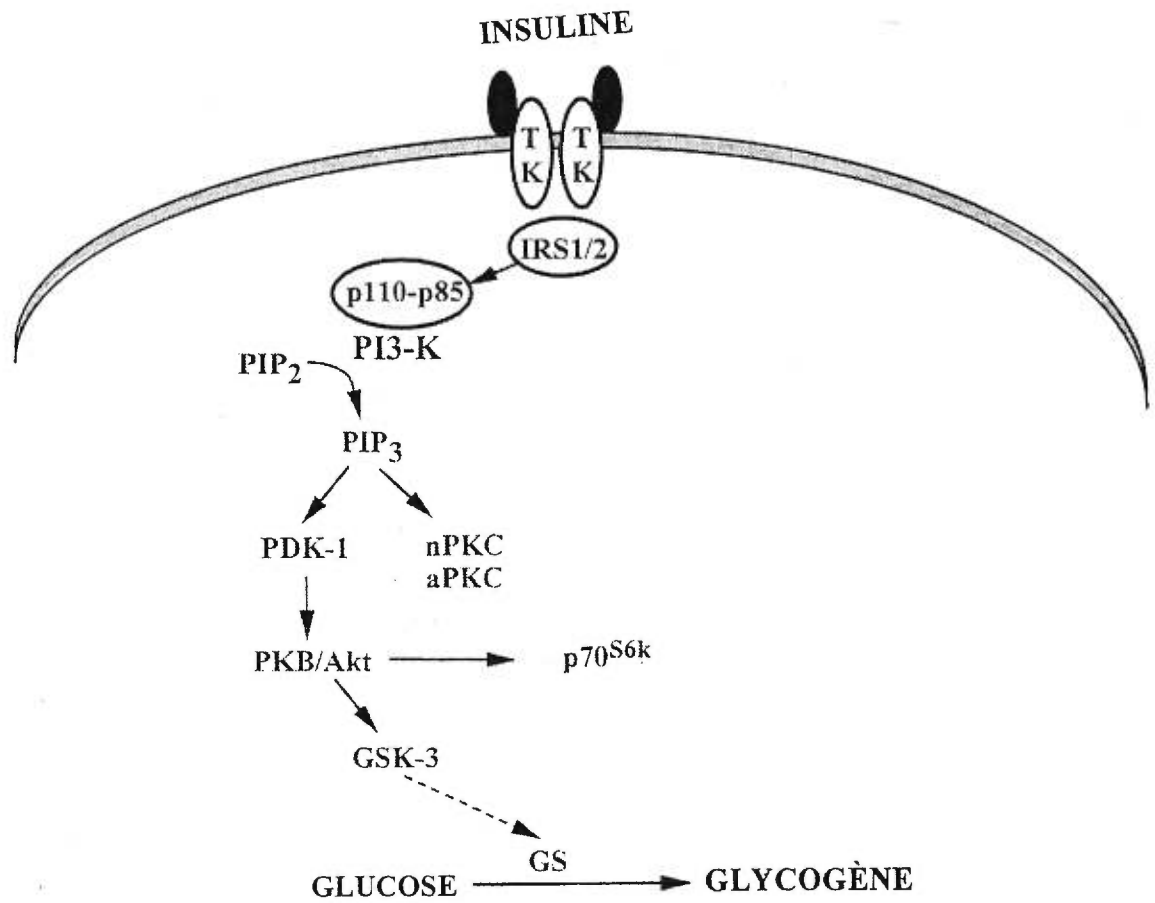


Figure 5. Mécanismes de transduction du signal par la voie PI3-K

dégradé par des phosphatases lipidiques en $PI-3,4-P_2$. Ce dernier peut recruter certains effecteurs tel que la PKB/Akt à la membrane plasmique (Franke et al., 1997; Toker et Cantley, 1997). La ou les cibles directes de cette protéine reste à déterminer, mais pourraient inclure potentiellement les canaux calciques des cellules neuronales. Il a été montré que "l'insulin-like growth factor-1" (**IGF-I**) module les canaux calciques neuronaux de type L et N de manière dépendante de la PI3-K. Donc, les canaux calciques pourraient être les cibles des récepteurs tyrosine kinase (**RTK**) (Lesley et al., 1997). Cependant, les mécanismes précis impliqués dans cette action demeurent inconnus, et aucune évidence n'existe à ce jour pour le récepteur à l'insuline. D'autres chercheurs ont montré que le calcium peut moduler directement l'activité PI3-K (Singh et al., 1995). Récemment, il a été rapporté que l'activation de la PI3-K par la calmoduline est dépendante du calcium (Joyal et al., 1997). Cependant, le rôle du calcium dans l'activation de la PI3-K par l'insuline est inconnu.

En plus d'une activité lipide kinase (Whitman et al., 1985), la p110 possède une activité sérine kinase (Carpenter et al., 1993) dont les substrats sont la sous-unité p85 de la PI3-K et l'IRS-1 (Lam et al., 1994), créant ainsi probablement un système de contrôle ou de rétro-inhibition de cette voie de transmission du signal. La signification biologique de cette activité n'est pas complètement comprise (Lam et al., 1994).

Tandis que la voie majeure d'activation de la PI3-K par l'insuline utilise l'IRS-1, d'autres mécanismes peuvent être utilisés par l'insuline. Un des mécanismes passe par Ras. Il a été démontré que Ras-GTP interagit directement avec la PI3-K (Sjolander et al., 1991; Rodriguez-Viciana et al., 1994). Il est bien connu que l'insuline active Ras via Grb2/Sos complexé à Shc ou à l'IRS-1 (Cheatham et Kahn, 1995). D'autres données suggèrent que PI3-K peut activer Ras (Hu et al., 1995). Il n'est pas clair si la PI3-K agit en amont ou en aval de Ras. Un autre mécanisme possible pour activer la PI3-K serait à travers la PKC. Il a été montré que les esters de phorbol qui activent la PKC, augmentent les niveaux cellulaires de PI-3,4,5-P₃ (Petritsch et al., 1995; Navé et al., 1996). Cependant, les bases moléculaires de ces observations ne sont pas claires.

b) La p70^{S6k}, PKB et PDK-1 : mécanismes d'activation

La PI3-K est un important régulateur de la p70^{S6k}, une sérine/thréonine kinase impliquée dans la transmission du signal mitogénique et dans la synthèse des protéines (Cheatham et al., 1994) et dont un des substrats est la protéine ribosomique S6. L'immunosuppresseur rapamycine est l'inhibiteur le plus puissant de la p70^{S6k} décrit et bloque son activation par tous les agents connus (revu dans Pullen et Thomas, 1997). L'isolement récent de la PKB/Akt, le comportement de cette kinase en réponse à l'insuline et à des inhibiteurs de la PI3-K permettent de supposer une étape intermédiaire entre la PI3-K et la p70^{S6k} (Burgering et Bos, 1995) (figure 5). Les messagers lipidiques de la PI3-K lient et activent une protéine kinase récemment découverte, la PDK-1, qui phosphoryle et active la PKB/Akt

(revu dans Cohen et al., 1997). Le mécanisme par lequel le PI-3,4,5-P₃ active la PDK-1 et la PKB/Akt n'est pas clair.

c) La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3)

La **GSK-3** est une sérine/thréonine kinase originalement découverte par sa capacité de phosphoryler et d'inactiver la glycogène synthase (**GS**) dont le rôle est la synthèse de glycogène (Cohen, 1985). Cohen et ses collègues ont découvert que la GSK-3 est phosphorylée et inactivée par la p90^{RSK} qui est elle-même activée par la MAPK (Saito et al., 1994; Cross et al., 1994) (figure 6).

L'autre mécanisme d'inactivation de la GSK-3 serait par la voie PI3-K (figure 5). La stimulation par l'insuline inhibe la GSK-3 en induisant la phosphorylation sur les résidus sérines. Cette phosphorylation est bloquée par un inhibiteur de la PI3-K ce qui suggère que l'activité PI3-K est requise pour ce processus (Cross et al., 1994). Cross et al. (1997) ont aussi montré que la PKB/Akt phosphoryle et inactive la GSK-3.

L'IRS-1 est une nouvelle cible potentielle de la GSK-3 in vitro et dans les cellules intactes. La phosphorylation de l'IRS-1 par la GSK-3 sur les résidus sérines abolit l'interaction de l'IRS-1 avec la région juxtamembranaire du récepteur à l'insuline résultant en une rétroaction négative (Eldar-Finkelman et Krebs, 1997).

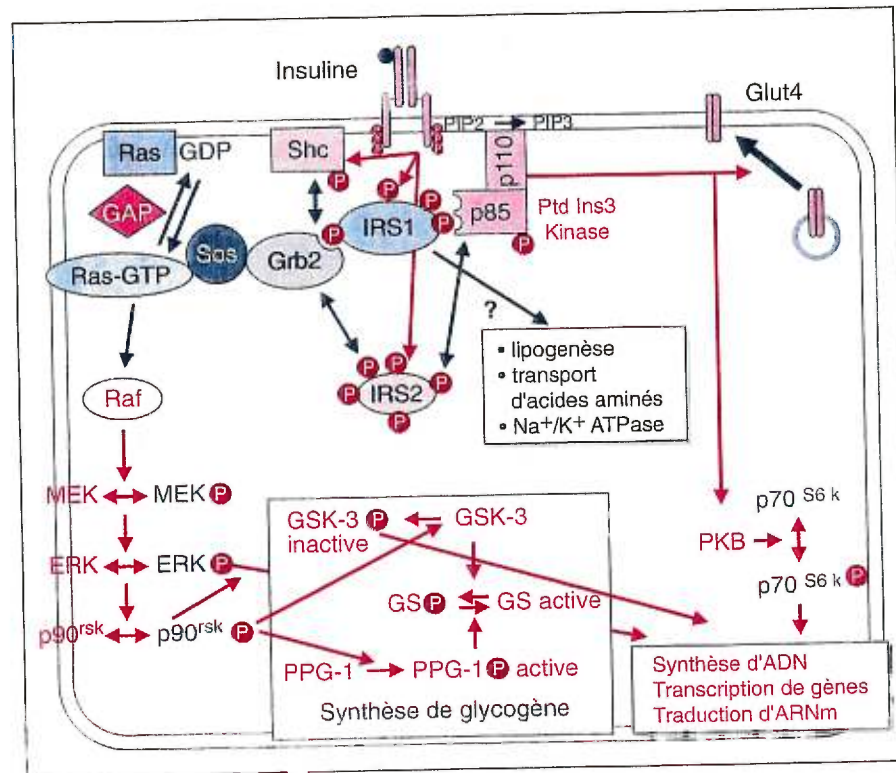


Figure 6. Les principales voies de transmission du signal insuline. La liaison de l'insuline à la sous-unité α du récepteur stimule l'activité tyrosine kinase intrinsèque de la sous-unité β , ce qui provoque une autophosphorylation du récepteur ainsi que la phosphorylation sur les résidus tyrosines de l'IRS-1, IRS-2 et Shc. Ces substrats interagissent alors avec des effecteurs intracellulaires possédant des domaines SH2. IRS-1 et IRS-2 se lient à la PI3-K, impliquée dans les effets prolifératifs de l'insuline, dans la synthèse de glycogène ainsi que dans le transport de glucose. IRS-1, IRS-2 et Shc, peuvent recruter Grb2/Sos, activant ainsi la cascade de kinases Raf/MEK/ERK(MAPK) responsable de la croissance cellulaire et de la synthèse de glycogène. L'inactivation de la GSK-3 active eIF-2B, un facteur d'initiation de la traduction. PPG-1: protéine phosphatase 1, GS: glycogène synthase, GSK-3: glycogène synthase kinase-3, PIP2: PtdIns3,5P2, PIP3: PtIns3,4,5P3. (Pinget et Roques, 1996).

d) Rôle de la PI 3-K dans l'action de l'insuline

La PI3-K a été purifiée à partir du foie, du thymus et du cerveau (revu dans Parker et Waterfield, 1992), et est une enzyme importante dans le mécanisme de signalisation au niveau des tissus cibles de l'insuline. La wortmannine, qui est un puissant inhibiteur de l'enzyme, a été utilisée pour démontrer le rôle essentiel de l'activation de la PI3-K dans le transport de glucose et dans l'effet antilipolytique de l'insuline au niveau des cellules adipeuses (Okada et al., 1994; Lam et al., 1994). L'insuline augmente le transport de glucose en permettant la translocation du transporteur de glucose Glut4 des compartiments intracellulaires à la membrane plasmique (Lienhard et al., 1992). Des études ont montré que la wortmannine et le LY294002, un autre inhibiteur de la PI3-K, abolissent cette translocation dans les adipocytes (Cheatham et al., 1994 a ou b). D'autres auteurs ont aussi démontré que l'inhibition de l'activation de la PI3-K dans les adipocytes 3T3-L1 prévient la stimulation de la synthèse de glycogène par l'insuline (Shepherd et al., 1995), la translocation de Glut1 et Glut4 (Clarke et al., 1994), la stimulation de la p70^{S6k} et la synthèse de l'ADN (Cheatham et al., 1994 a ou b). Au niveau du foie, il a été récemment suggéré que les produits de la PI3-K particulièrement le PI-3,4,5-P₃, inhibent la glucose-6-phosphatase de la membrane du réticulum endoplasmique (**RE**) (Mithieux et al., 1998). Cette enzyme présente essentiellement dans le foie et dans le rein a pour fonction principale d'hydrolyser le glucose 6 phosphate en phosphate et en glucose et de libérer ce dernier dans la circulation sanguine pour maintenir la normoglycémie. La PI3-K pourrait donc jouer un rôle dans l'inhibition de la production hépatique de glucose par l'insuline. De même, Carlsen et al.

(1997) à l'aide de la wortmannine ont montré que la PI3-K est impliquée dans la synthèse de glycogène en réponse à l'insuline dans les hépatocytes. La PI3-K joue donc un rôle important dans le métabolisme du glycogène hépatique.

1.2.4- La cascade mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Les MAPKs sont des protéines kinases à spécificité sérine/thréonine ayant un poids moléculaire d'environ 40,000 Da, identifiées en 1987 par Ray et Sturgill. Elles ont été purifiées et clonées (Boulton et al., 1990, 1991) et différentes isoenzymes ont été identifiées, dont **Erk1** et **Erk2** (extracellular signal-regulated kinase). Elles peuvent être activées par plusieurs facteurs de croissance, dont l'EGF, le PDGF et l'insuline, par des RCPG, mais aussi par toute une autre série d'agents dont les esters de phorbol et l'acide okadaïque (Thomas et al., 1992). Ces enzymes sont essentiellement inactives quand elles sont déphosphorylées. Anderson et collaborateurs. (1990) ont clairement montré que l'activation de cette enzyme résulte d'une double phosphorylation sur des résidus tyrosines et thréonines effectuée par la MAPK Kinase (**MAPKK**) ou **MEK**, une kinase à double spécificité. Dans cette section nous allons discuter du mécanisme d'activation et de régulation de la MAPK par l'insuline, l'activation de la MAPK par les RCPG et les autres agents sera discutée plus loin dans le chapitre 3.4.

a) La voie Ras/Raf/MAPK et sa régulation

La voie Ras/Raf/MAPK a été hautement conservée durant l'évolution et la plupart des composantes ont été identifiées dans diverses espèces telles que la drosophile, *C. elegans* et aussi chez les mammifères (Margolis et Skolnik., 1994). Grb2 est une petite protéine adaptatrice présentant un domaine SH2 et deux domaines SH3. C'est ainsi que Grb2 est lié de manière constitutive à travers son domaine SH3 à Sos, une protéine cytosolique d'échange des nucléotides guanines de Ras. Par son domaine SH2, Grb2 peut se lier à l'IRS-1 ou à Shc lorsque ces derniers sont phosphorylés sur des tyrosines en réponse à l'insuline. Shc, qui est également substrat du récepteur à l'insuline, présente un domaine PTB semblable à celui de l'IRS-1. Par cette région, l'IRS-1 et Shc interagissent selon des propriétés différentes avec le récepteur (Paz et al., 1996), ce qui pourrait constituer une étape de recrutement du complexe formé (Shc/Grb2/Sos ou IRS-1/Grb2/Sos) vers la membrane plasmique où se situe Ras (Tartare-Deckert et al., 1995). La contribution relative des protéines Shc et IRS-1 dans la cascade MAPK est apparemment spécifique aux tissus et aux cellules cibles.

Ras est une petite protéine G de 21 kDa dont l'état varie entre une forme inactive liée au GDP et active liée au GTP. Elle est sous le contrôle de GAP, une protéine qui hydrolyse le GTP, et de Sos qui favorise le relargage de GDP (Chardin, 1994; Gingras et Donzé, 1995). Les protéines Ras activées déclenchent une cascade de phosphorylation dans laquelle les MAPK relayent le signal mitogénique de l'insuline. En effet, Ras-GTP stimulé par le complexe Grb2/Sos, active la

sérine/thréonine kinase Raf-1 (connue aussi sous le nom MAPK Kinase Kinase - **MAPKKK**) en provoquant sa translocation vers la membrane plasmique. Raf-1 engendre ensuite la stimulation séquentielle des kinases cytoplasmiques suivantes: MEK, MAPK (Erk1/2) et finalement la p90^{RSK} (Seger et Krebs, 1995) (figure 6).

Les MAPK représentent en fait une grande famille d'enzymes homologues. On y retrouve la famille MAPK elle-même (Erk 1/2), JNK, et p38 (Cobb et Goldsmith, 1995). L'activation de Ras mène à l'activation de tous les membres de cette famille. Par contre chaque famille possède des MEK kinases (MEKK) spécifiques (Cobb et Goldsmith, 1995; Marshall, 1995). Il n'est pas connu si l'activation de Ras par l'insuline mène à l'activation des familles de la MAPKs autres que Erk 1/2. On sait seulement que dans les cellules CHO l'insuline active la MAPK et non JNK (Rutter et al., 1995).

L'activation de la MAPK par les RTK se fait surtout par un mécanisme dépendant de Ras (Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992) et indépendant du calcium (Chao et al., 1992; Ginés et al., 1995). Cependant, le calcium seul peut activer la voie MAPK. La stimulation de l'influx de calcium à travers des canaux calciques dépendants du voltage stimule la MEK et la MAPK, *via* l'activation de Ras, dans les cellules neuronales (Rosen et al., 1994). Rosen et Greenberg. (1996) ont aussi montré que l'influx de calcium induit la phosphorylation des tyrosines du récepteur à l'EGF, ce qui induit l'activation de la cascade MAPK à travers le complexe Shc/Grb2/Sos. Ce mécanisme n'a cependant pas été étudié dans le foie et il n'est

pas connu si le récepteur à l'insuline peut activer la MAPK à travers un influx de calcium.

Les MAPK seraient capables de réaliser un rétrocontrôle négatif de la voie qui les active. Ainsi, Erk phosphorylerait Sos sur des résidus sérines/thréonines, ce qui dissocierait le complexe Grb2/Sos, donc désactiverait Ras et, par conséquent, interromprait la transmission du signal (Langlois et al., 1995). Récemment des travaux ont rapporté une rétroaction négative de la MAPK (De Fea et Roth., 1997) sur l'IRS-1/2 à travers leur phosphorylation sur les sérines/thréonines. Cela diminue l'interaction avec le récepteur à l'insuline dans la région juxtamembranaire (Paz et al., 1997).

b) Le rôle de la MAPK dans l'action de l'insuline

La MAPK est activée par l'insuline dans plusieurs types cellulaires incluant les adipocytes (Haystead et al., 1990), le muscle squelettique (Hei et al., 1993) et les hépatocytes (Ray et Sturgill, 1988; Peak et al., 1993). Dans le foie intact, l'insuline injectée dans la veine porte active la MEK, Erk1/2 et la p90^{RSK} (Tobe et al., 1992). Le PD098059, un inhibiteur de la MEK, a permis de mettre en évidence l'inhibition de la stimulation de la synthèse de l'ADN (Dudley et al., 1995), une conséquence de l'activation de la MAPK par les facteurs de croissance (Seger et Krebs, 1995). Le rôle de la MAPK ne semble pas être limité à une régulation de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire. La MAPK pourrait également jouer un rôle central dans la transmission des effets métaboliques de l'insuline. Cohen et ses

collaborateurs. (1993) ont élucidé un mécanisme dans lequel l'activation de la cascade MAPK par l'insuline stimule la synthèse de glycogène en activant la GS. En réponse à l'insuline, la GS est activée par déphosphorylation sous le contrôle de la protéine phosphatase-1G (**PP1G**) (activée par p90^{RSK}), et de la GSK-3 (inactivée par p90^{RSK}) dans le muscle squelettique. Aucune évidence pour un tel mécanisme n'a été présentée dans le foie. Cependant, malgré son inhibition de la stimulation de la MAPK par l'insuline, le PD 098059 ne contrecarre pas les effets de l'hormone sur le transport de glucose, la lipogénèse et la synthèse de glycogène dans les adipocytes 3T3-L1 et dans les myoblastes L6 (Lazar et al., 1995). Il est donc difficile de relier l'activité MAPK à un effet physiologique de l'insuline. Ceci est probablement dû aux différents mécanismes de régulation de la MAPK selon les différents types de cellules utilisées.

La transmission du signal de l'insuline semble se faire selon un réseau de voies distinctes et interconnectées. Des chercheurs ont montré que la sous-unité p85 de la PI3-K peut interagir avec le domaine SH3 de Grb2 (Wang et al., 1995) connectant ainsi la voie PI3-K à la cascade MAPK. De plus, il y a plusieurs évidences que dans certains types cellulaires, l'inhibition de l'activité PI3-K par la wortmannine bloque l'activation de la MAPK par l'insuline (Cross et al., 1994). Dans les cellules L6 du muscle squelettique de rat, la wortmannine inhibe l'activation de quatre protéines kinases (Raf, MAPKK, MAPK et MAPKAPK-1) qui forment la cascade MAPK, à des concentrations similaires à celles qui inhibent la PI3-K dans d'autres cellules (Cross et al., 1994). D'autres auteurs ont montré que l'effet de cet

inhibiteur sur l'activité de Erk varie non seulement d'une lignée cellulaire à l'autre mais à l'intérieur d'une même lignée cellulaire selon le facteur de croissance et la concentration utilisés (Duckworth et Cantley, 1997). On ne peut donc pas exclure, la possibilité qu'il existe un croisement entre les deux voies de signalisation et que la MAPK soit également impliquée dans les effets métaboliques de l'insuline.

Dans les tissus différenciés et non proliférateurs, comme le foie, on postule que la MAPK jouerait plutôt un rôle dans la régulation du métabolisme par l'insuline et par les facteurs de croissance. Les éléments de signalisation menant à la synthèse du glycogène ne sont pas clairement définis et les voies de signalisation peuvent être différentes d'un type cellulaire à un autre. Dans les cellules hépatiques, à part la phosphorylation du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 (White et Kahn, 1994) et l'activation de la GS (Hers, 1990) peu de choses sont connues sur les voies de signalisation de l'insuline. Dans les hépatocytes isolés, il est difficile de démontrer un effet propre de l'insuline sur la synthèse de glycogène. L'effet stimulateur de l'insuline sur la GS dans les hépatocytes isolés n'est détectable qu'en présence de fortes concentrations de glucose. Probablement par ce qu'une augmentation de glucose-6-phosphate (**G6P**) est nécessaire et celle-ci n'est observable qu'en présence de fortes concentrations de glucose. Récemment, Carlsen et al. (1997) en utilisant une préparation d'hépatocytes isolés de rat par la méthode de perfusion à l'EDTA pendant 30 minutes, ont réussi à mesurer l'incorporation du glucose dans le glycogène en réponse à l'insuline. En effet, quand les cellules sont incubées en présence de glucose, de bacitracine (prévient la dégradation des hormones) et des

inhibiteurs de protéases (Christiansen et Carlsen, 1995), la stimulation de la synthèse de glycogène se fait à des concentrations physiologiques d'insuline. Carlsen et al. (1997) ont démontré que dans ces cellules l'inhibition de la MEK par le PD098059 bloque l'incorporation du glucose dans le glycogène impliquant la voie MAPK dans la synthèse de glycogène au niveau des cellules hépatiques. A l'aide de la wortmannine et de rapamycine, cette étude montre que la PI3-K et la MAPK mais non la $p70^{S6k}$ sont impliqués dans la synthèse de glycogène en réponse à l'insuline dans les hépatocytes.

1.2.5- Rôle des phosphatases dans l'action de l'insuline

Longtemps moins bien étudiées que les protéines kinases, les protéines phosphatases sont aussi importantes dans la régulation des phénomènes biologiques (Cohen, 1989). Il a été montré que l'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatases de type PP1 et PP2A), inhibe les effets de l'insuline sur la lipogénèse et la glycogénèse (Hess et al., 1991) indiquant l'implication possible des phosphatases dans l'action de l'insuline.

Les phosphatases à sérine/thréonine ont été classifiées selon leur spécificité envers différents substrats et leur sensibilité aux différents inhibiteurs en quatre groupes: PP1, PP2A, PP2B et PP2C (Cohen, 1989). La PP1 a été identifiée dans le muscle squelettique, elle est impliquée dans la stimulation de la synthèse de glycogène par l'insuline. C'est dans ce tissu que la cascade menant à l'activation de la GS a été d'abord élucidée (Dent et al., 1990). Au niveau du foie et du muscle, la majorité de

l'activité de la GS phosphatase est exercée par la PP1 dont il existe une forme cytosolique et une forme associée au glycogène dite PP1G. Cette forme fait l'objet d'une régulation par phosphorylation par l'insuline (activation) et par déphosphorylation par des hormones glycogénolytiques tel que l'épinéphrine (inactivation) (Cohen, 1993). Cette forme correspond à la liaison de la sous-unité catalytique C de PP1 avec une sous-unité " glycogen-binding-protein" dite G. L'insuline, en activant la p90^{RSK} (ou ISPK : insulin-stimulated protein kinase) (Dent et al., 1990) entraîne la phosphorylation d'un résidu sérine de la sous-unité G nommé site 1. Ceci active la GS (déphosphorylation par la PP1G) (figure 6) et inactive la glycogène phosphorylase (déphosphorylation par la PP1G) dans le muscle squelettique (Dent et al., 1990; Challiss et al., 1987). Ceci est compatible avec la démonstration par van de Werve et al. (1977) que l'administration de l'insuline *in vivo* à des lapins inactive la phosphorylase kinase hépatique.

1.2.6- Insuline et protéine G

Les protéines $G\alpha_1$, $G\alpha_2$ et $G\alpha_3$ constituent la sous-famille des protéines G inhibitrices (**Gi**), découvertes en tant que substrats de la toxine de bordetella pertussique et reconnus actuellement comme des éléments essentiels du couplage des récepteurs inhibiteurs au système adénylyl cyclase. Le rôle des protéines Gi dans la transmission du signal de l'insuline a été récemment illustré par l'utilisation de souris qui expriment un transgène constitué d'une séquence nucléotidique partielle antisens $G\alpha_2$. Ces animaux présentent une hyperinsulinémie, une perte de tolérance au glucose, une résistance à l'insuline et aussi une perte de l'activation de

la GS hépatique par l'insuline. De plus, la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 par l'insuline est fortement diminuée, probablement dû à l'augmentation de l'activité phosphotyrosine phosphatase (PTP1B) (Moxham et Malbon, 1996).

G_i est apparemment impliquée dans les mécanismes de l'influx de calcium dans les hépatocytes (Berven et Barritt., 1994). Il est connu que la sous-unité G_i inhibe l'adenylyl cyclase (Taussig et al., 1993) et, chez les hépatocytes, cette propriété ainsi que la stimulation de l'activité phosphodiesterase par l'insuline sont dépendantes de la présence du calcium extracellulaire (Irvine et al., 1993). Enfin, le niveau de phosphorylation de G_i est diminué dans les hépatocytes exposés à l'insuline (Morris et al., 1995). Dans les cellules CHO transfectées avec le récepteur à l'insuline humain (CHO-IR), il a récemment été montré que l'insuline induit un influx de calcium qui est dépendant d'une protéine G sensible à la toxine pertussique (Nie et al., 1998). D'autres chercheurs ont démontré qu'un canal cationique perméable au calcium est activé spécifiquement par la sous-unité $G_{i\alpha_2}$ (Kanzaki et al., 1997). Cependant, il n'y a pas d'évidences que l'insuline augmente l'influx de calcium de manière dépendante d'une protéine G_i dans les cellules cibles de l'insuline telles que les hépatocytes. Donc, les mécanismes sensibles à la toxine pertussique sont probablement impliqués dans l'action de l'insuline et dans la régulation de l'influx de calcium, mais les voies d'activation ne sont toujours pas bien compris.

1.2.7- Seconds messagers putatifs de l'insuline

a) L'inositol-phosphoglycan

Les premiers travaux consacrés à la recherche de seconds messagers intracellulaires de l'insuline ont permis de mettre en évidence, la présence d'un inositol phosphoglycan (IPG) qui a été partiellement purifié à partir des membranes plasmiques de foie (Saltiel et Cuatrecasas, 1986). Cet IPG est généré par l'hydrolyse d'un précurseur ancré dans la membrane plasmique à l'intérieur de la cellule, le glycosyl phosphatidylinositol (GPI), par une PLC spécifique. Les produits de l'hydrolyse sont l'IPG et le 1,2 DAG. Les deux peuvent avoir un effet régulateur sur les enzymes intracellulaires (Low et Saltiel, 1988). Cet IPG imite certains effets de l'insuline incluant l'inhibition de la lipolyse et de la néoglucogénèse, l'augmentation de la lipogénèse et du transport de glucose (Kilgour, 1993). Récemment il a été montré que l'IPG inhibe les oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ induites par la phényléphrine (Sanchez-Bueno et al., 1997) et reproduit les effets de l'insuline sur le pic de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les hépatocytes stimulés par les agents α_1 -adrénergiques (Somogyi et al., 1992). Cependant, la PLC impliquée et le mécanisme par lequel sa stimulation est couplée au récepteur à l'insuline demeurent inconnus.

b) Le diacylglycérol (DAG)

Le DAG est un activateur de PKC. Plusieurs études ont montré qu'en général l'insuline génère le DAG. Dans les tissus exprimant GLUT4 (le muscle squelettique et les adipocytes) l'insuline augmente rapidement le contenu en DAG par 40-50 % dans des préparations *in vivo et in vitro* (Boggs et al., 1991; Towns et al., 1993). Cependant, l'insuline génère aussi du DAG dans les cellules qui n'expriment pas GLUT4 telles que les myocytes BC3H1 et les hépatocytes (Farese et al., 1985, 1992; Cooper et al., 1990). Il a été montré que l'insuline provoque une augmentation de l'activité de la PKC ainsi qu'une augmentation de la concentration du DAG au niveau du foie (Cooper et al., 1990). Le rôle des PKC dans l'action de l'insuline n'est pas bien clair et varie selon les cellules et les tissus utilisés. Dans les cellules non-hépatiques, la PKC ζ (zeta) est requise pour la stimulation de la synthèse des protéines par l'insuline (Mendez et al., 1997). Il a aussi été montré qu'une expression excessive de la PKC ζ mène à la translocation de GLUT4. Ceci implique les PKC atypiques dans l'action de l'insuline sur le transport de glucose (Standaert et al., 1997, Bandyopadhyay et al., 1999). D'autres chercheurs, ont montré que certaines isoformes de PKC hépatocellulaires qui sont activées par le calcium et les phospholipides sont altérées dans les modèles de rat génétiquement obèses (*fa/fa*) et ceux rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine (van de Werve et al., 1987; Garcia-Sainz et al., 1992; Tang et al., 1993; Croquet et al., 1996). Donc certaines isoformes de PKC peuvent jouer un rôle dans la transduction du signal de l'insuline dans les cellules hépatiques dans des conditions physiologiques et pathophysiologiques.

II- LE RÔLE DU CALCIUM DANS L'ACTION DE L'INSULINE

Le rôle du calcium dans l'action de l'insuline a été proposé à l'origine par Clausen et al. en 1974. Cependant, d'autres chercheurs n'avaient pas observé de relation entre le calcium et l'action de l'insuline (Graves et al., 1976, Plehwe et al., 1983). Jusqu'à 1985, il était difficile de mesurer le calcium cytosolique directement. Les méthodes utilisant le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ n'étaient pas complètement adaptées à cette mesure car le calcium dans la cellule est dans un état dynamique, il est rapidement libéré, lié et séquestré par plusieurs systèmes intracellulaires. Les sondes fluorescentes comme quin-2 et fura-2 permettent aujourd'hui la mesure directe des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules vivantes et, entre autres, dans les cellules cibles de l'insuline.

2.1- L'EFFET DE L'INSULINE SUR LE CALCIUM INTRACELLULAIRE DANS DIVERS TYPES CELLULAIRES

Le transport de glucose stimulé par l'insuline est diminué en absence de calcium extracellulaire (Bonne et al., 1977, 1978) appuyant la possibilité qu'il existe une relation étroite entre l'augmentation de l'influx de calcium et le transport de glucose. Draznin et ses collaborateurs ont observé un effet dépendant de la dose de l'insuline et du glyburide (un sulfonyluré hypoglycémiant) sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les adipocytes humains (Draznin et al., 1988) et de rat (Draznin et al., 1987a, 1987b), où l'augmentation de l'influx de calcium se fait, entre autres, via des canaux calciques sensibles au voltage. Draznin et al. (1987b) ont aussi montré qu'un niveau

optimal (entre 140 et 370 nM) de $[Ca^{2+}]_i$ est requis pour le transport de glucose stimulé par l'insuline, et qu'au delà de ces valeurs, la réponse cellulaire est diminuée. Dans les cellules musculaires, certains auteurs n'observaient pas d'effet de l'insuline sur la $[Ca^{2+}]_i$ malgré la stimulation continue du transport de glucose (Klip, 1984; Farese et al., 1985). Des études récentes suggèrent que les canaux calciques sensibles au voltage peuvent jouer un rôle dans l'activation du transport de glucose stimulé par l'insuline dans le muscle squelettique (Westfall et Sayeed, 1990; Cartee et al., 1992; Foot et Leighton, 1994; Young et Balon, 1997). D'autres ont montré que des concentrations physiologiques d'insuline augmentent la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules du muscle lisse vasculaire en culture primaire (Touyz et Schiffrin, 1994). Cet effet est en partie aboli par des inhibiteurs de PKC, et est bloqué par le diltiazem, un inhibiteur de canaux calciques voltage-dépendants. Le récepteur à l'IGF-1, qui a une structure similaire au récepteur à l'insuline, augmente la $[Ca^{2+}]_i$ en activant un canal perméable au calcium dans les fibroblastes Balb/c3T3 (Kojima et al., 1988; Kojima et al., 1992). Similairement, dans les cellules CHO transfectées avec le récepteur à l'insuline humain (CHO-IR), l'insuline augmente le calcium cytosolique en activant un canal cationique indépendant du voltage et perméable au calcium (Nie et al., 1998). Donc, selon le type de cellule utilisée, l'insuline est capable d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ à travers des canaux calciques qui sont soit indépendants, soit dépendants du voltage. Cependant, les cellules CHO ne représentent pas un tissu cible de l'insuline. Dans le foie, une étude utilisant un indicateur de calcium, l'arsenazo III et la titration du calcium dans les hépatocytes de rat perméabilisés à la digitonine a montré que l'insuline (85 nM) augmente la

$[Ca^{2+}]_i$ à l'équilibre de 200 à 630 nM (Strunecka, 1985). Donc le calcium pourrait jouer un rôle important dans l'action de l'insuline dans divers types cellulaires incluant celles du foie. Comme il sera vu plus loin, les cellules hépatiques ne présentent pas de canaux calciques voltage-dépendants et aucune étude mesurant directement les variations de calcium en réponse à l'insuline n'a été faite dans des cellules hépatiques entières.

2.2- EFFET DU CALCIUM SUR DIFFÉRENTES RÉPONSES PHYSIOLOGIQUES DE L'INSULINE

Bien que les ions calcium soient traditionnellement considérés comme des médiateurs des effets hormonaux cataboliques dans le foie, de nouvelles données les impliquent aussi dans d'autres voies. Par exemple, le calcium joue un rôle dans l'activation de la MAPK dans diverses cellules épithéliales (Chao et al., 1992) incluant celle du foie (Romanelli et van de Werve, 1997). Le calcium pourrait donc être impliqué dans les effets de l'insuline dans le foie puisque cette dernière active la MAPK. Dans les cellules CHO-IR, Nie et collaborateurs. (1998) ont montré que l'insuline active un canal de 10 pS perméable au calcium. Quand ce canal est bloqué par le nickel, l'effet de l'insuline sur la synthèse de l'ADN (une conséquence de l'activation de la MAPK par les facteurs de croissance (Seger et Krebs, 1995)) est aussi bloqué. Il a été montré récemment que la dexfenfluramine (Dexf), un agent hypoglycémiant qui imite divers effets de l'insuline dans les hépatocytes de rat, peut aussi augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ (Comte et al., 1997). Peu d'études ont examiné

l'importance du flux de calcium dans l'action de l'insuline sur les cellules du foie, un organe cible important de l'insuline. Il a été montré que la stimulation de la phosphodiésterase dépendante de l'APMc, de l'oxydation du succinate et de la synthèse des protéines par l'insuline sont inhibés en absence du calcium extracellulaire dans les cellules hépatiques (Rogers et al., 1991; Irvine et al., 1993). Ceci est en accord avec l'observation que la stimulation de la synthèse des protéines et l'inhibition de la lipolyse par l'insuline dans les adipocytes de rat sont diminués lorsque le calcium extracellulaire est enlevé (Akhtar et Perry, 1979). La présence de calcium extracellulaire peut augmenter l'affinité de l'insuline pour son récepteur, mais seulement à haute concentration (10 mM) (Williams et al., 1990). Les effets des concentrations physiologiques de calcium sont modestes (Akhtar et Perry, 1979; Williams et al., 1990).

2.3- RÉSISTANCE À L'INSULINE ET CALCIUM

La pathophysiologie du diabète dans toutes ses formes est due à une déficience dans la signalisation de l'insuline. Dans le diabète de type I, ceci résulte de la déficience en insuline, tandis que dans le diabète de type II ainsi que pour la plupart des formes secondaires du diabète, le défaut primaire est la résistance à l'action de l'insuline au niveau de ses cellules cibles. Toute compréhension du diabète requiert donc la compréhension des mécanismes d'action de l'insuline au niveau cellulaire. Les deux types de diabète sont associés à des dérangements dans la régulation du calcium intracellulaire (augmentation de $[Ca^{2+}]_i$), incluant le foie

(Chan et Junger, 1984; Studer et Ganas, 1989; Draznin, 1993; Levy et al., 1994; Masry et Smogorzewski, 1997). Des $[Ca^{2+}]_i$ élevées ont été trouvées dans des hépatocytes de rat rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine (Studer et Ganas, 1989). Malgré que les altérations du métabolisme du glycogène hépatique soient bien documentés, le lien entre des $[Ca^{2+}]_i$ élevées et la résistance à l'insuline reste à définir. Le calcium semble donc jouer un rôle important dans l'action de l'insuline dans l'état physiologique et pathophysiologique.

Une $[Ca^{2+}]_i$ élevée n'altère pas la liaison de l'insuline à son récepteur mais diminue minimalement l'autophosphorylation de celle-ci et de son activité tyrosine kinase (10%) (Draznin et al., 1989). Ceci suggère qu'une $[Ca^{2+}]_i$ élevée exerce ses effets sur les étapes post-récepteur. Le récepteur et les substrats de l'action de l'insuline sont activés par phosphorylation ou déphosphorylation et sont influencés par le calcium intracellulaire. Il se pourrait donc que la $[Ca^{2+}]_i$ puisse affecter l'état de phosphorylation des protéines en modifiant l'activité de kinases et ou de phosphatases. Il est intéressant de postuler qu'un niveau très élevé ou soutenu de calcium intracellulaire puisse donner un signal de rétroaction pour terminer l'action de l'insuline. Il est concevable que le calcium lui-même ou *via* l'activation de la PKC puisse inhiber divers processus impliqués dans l'action de l'insuline. L'influence du changement de la $[Ca^{2+}]_i$ sur le récepteur et les étapes post-récepteur dans l'action de l'insuline n'ont pas été clairement étudiées.

Begum et collaborateurs. (1991) ont montré qu'une augmentation soutenue de la $[Ca^{2+}]_i$ inhibe la déphosphorylation du récepteur à l'insuline, du récepteur à l'EGF et de la GS dans les adipocytes. La GS est une enzyme clé dans la synthèse de glycogène. Elle est normalement inactive en présence de $[Ca^{2+}]_i$ élevée (van de Werve et al., 1983; Cohen, 1988). Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ inhibe la déphosphorylation de la GS (Begum et al., 1991) la maintenant dans un état inactif. Ceci entraîne la diminution de la synthèse du glycogène, qui contribue à la résistance à l'insuline dans le cas du diabète non insulino-dépendant (NIDDM). En accord avec ceci, van de Werve. (1989) a montré que l'activité de la glucose-6-phosphatase hépatique est modulée par des concentrations physiologiques de calcium intracellulaire et est inhibée par des $[Ca^{2+}]_i$ élevées. En dernier lieu, Begum et al. (1991) ont rapporté que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ inhibe la déphosphorylation des résidus tyrosines et sérines car elle interfère avec la déphosphorylation de tyrosines du récepteur à l'insuline et la déphosphorylation de sérines de la GS. Donc, l'inhibition de la déphosphorylation des enzymes intracellulaires sensibles à l'insuline par des $[Ca^{2+}]_i$ élevées peut diminuer la réponse à l'insuline indépendamment de l'état de phosphorylation du récepteur à l'insuline.

III- LES AGENTS MOBILISATEURS DE CALCIUM

Les hormones cataboliques telles que le glucagon et les catécholamines α - et β -adrénergiques, se lient à la membrane des hépatocytes via des récepteurs spécifiques. Ces récepteurs appartiennent à la famille des RCPG caractérisés par sept domaines transmembranaires, et qui exercent leurs effets à travers des messagers solubles intracellulaires (Dohlman et al., 1991). La cascade de signalisation implique un couplage initial entre le récepteur activé et les protéines G hétérotrimériques qui consistent en une sous-unité α (où se lie le GTP et qui contient une activité GTPasique intrinsèque) et d'un complexe $\beta\gamma$ (Rens-Domiano et Hamm, 1995). La liaison de l'agoniste à son récepteur spécifique induit la dissociation de la protéine G en deux complexes: $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$. Il existe diverses sous-unités α , β et γ qui interagissent avec des protéines effectrices spécifiques lorsqu'elles sont activées et mènent à une cascade de signalisation particulière (Birnbaumer, 1992). Par exemple $G\alpha_s$ -GTP stimule tandis que $G\alpha_i$ -GTP inhibe l'adénylyl cyclase. Ceci module la concentration de l'AMPc et l'activité de la protéine kinase A (PKA). La sous unité $G\alpha_q/11$ activée par les agents mobilisateurs de calcium stimule l'isoforme β de la PLC (PLC- β) qui scinde le PIP_2 en IP_3 et DAG. Le premier mobilise le calcium à partir des réserves intracellulaires du calcium, tandis que le second active la PKC (figure 7). Les ions calcium sont connus pour participer dans la modulation hormonale du métabolisme du glucose hépatique (Kraus-Friedmann, 1984; Pilkis et Granner, 1992).

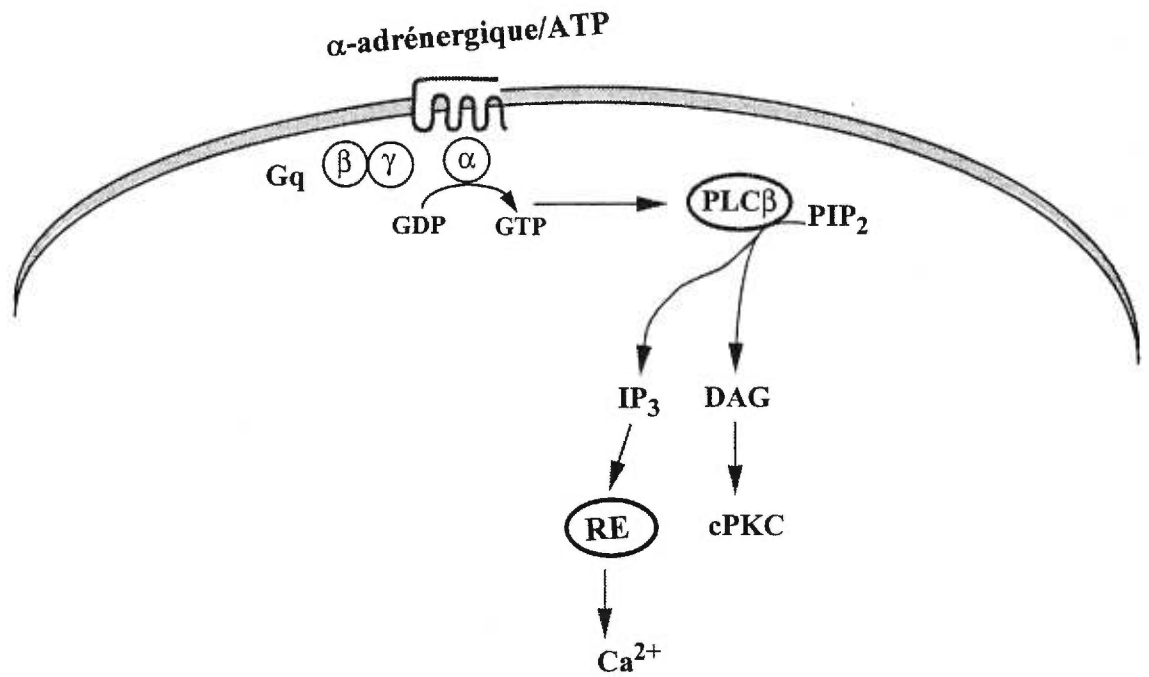


Figure 7. Stimulation de la phospholipase C β par les récepteurs couplés à Gq. La stimulation de la PLC β mène à la production d'IP $_3$ et de DAG. L'IP $_3$ mobilise les réserves intracellulaires de calcium du RE et le DAG active la PKC. PLC: phospholipase C, PIP $_2$: phosphatidylinositol bisphosphate, DAG: diacylglycérol, IP $_3$: inositol trisphosphate.

Dans le foie, les agents mobilisateurs de calcium (α_1 -adrénergiques, vasopressine, angiotensine II et ATP) qui vont faire l'objet de cette discussion, altèrent plusieurs processus métaboliques. Par exemple, les effets α_1 -adrénergiques résultent dans la stimulation de la glycogénolyse, de la gluconéogenèse, et du transport des acides aminés, alors que la lipogénèse et la synthèse de glycogène sont inhibées (Blackmore et Exton, 1985).

3.1- MÉCANISME D'ACTIVATION DE LA PHOSPHOLIPASE C β PAR LES RCPG

La PLC est présente dans tous les tissus et existe sous diverses formes, cytosoliques ou membranaires. L'utilisation des critères immunologiques permet de classer ces isoformes en quatre types: α , β , γ et δ , dont certaines comportent des sous-types. Dans cette section nous allons discuter de la régulation de la PLC β .

Les récepteurs à la vasopressine, à l'angiotensine II et aux catécholamines α_1 -adrénergiques exercent leurs effets physiologiques par des mécanismes indépendants de l'AMPc et qui induisent l'hydrolyse de phosphoinositides de la membrane plasmique. Leur activation provoque la stimulation d'une PLC membranaire, la PLC β_1 (Bristol et Rhee, 1994). La liaison de l'agoniste à son récepteur mène à l'activation de la protéine G par la dissociation de la sous-unité α du dimère $\beta\gamma$ et l'échange du GDP pour une molécule de GTP sur la sous-unité α . La recherche d'une protéine G non sensible à la toxine pertussique capable d'activer la PLC a été particulièrement difficile. Le groupe d'Exton a purifié et

identifié les protéines G responsables de l'activation de la PLC β_1 comme étant les sous-unités G α_q et G α_{11} (Taylor et Exton, 1987). L'activation de la PLC est fortement inhibée par des phosphorylations réalisées par la PKC par l'intermédiaire d'un processus de rétrocontrôle négatif (Rhee et al., 1991). Des études *in vitro* ont démontré que la PLC- β_1 possède une activité GTPase et pourrait ainsi agir dans un mécanisme de rétro-inhibition de G $\alpha_q/11$ (Bernstein et al., 1992). La caractéristique de cette voie réside dans le fait que la PLC entraîne la formation simultanée de deux seconds messagers: l'IP $_3$ et le DAG à partir du PIP $_2$ membranaire dont la faible concentration utilisable représente un facteur limitant (Berridge et Irvine, 1989; Downes et McPhee, 1990).

3.2- HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

Au niveau hépatique, la réponse cellulaire aux hormones dont les récepteurs sont couplés aux protéines Gq est biphasique dans le cas du calcium cytosolique (Berridge et Irvine, 1989). Le pic initial correspond à la mobilisation des réserves intracellulaires sensibles à l'IP $_3$, alors que la phase plus soutenue dépend d'un influx de calcium extracellulaire (Bygrave et Benedetti, 1993). Les mécanismes impliqués dans cette réponse sont complexes. La majorité des études sur le changement du flux de calcium dans les hépatocytes et le foie perfusé intact ont utilisé à l'origine, le $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Une importante avance technique a été la synthèse et le développement des sondes fluorescentes qui sont sensibles aux changements de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tsien et al., 1982). Les sondes fluorescentes quin-2 et plus récemment fura-2 et Indo-1 ont

été utilisées par la plupart des chercheurs pour mesurer les variations du calcium intracellulaire dans les cellules vivantes telles que les hépatocytes. Avec la découverte des indicateurs sensibles au calcium et le développement de systèmes d'analyse d'images il est donc devenu possible d'élucider comment le signal calcique est distribué dans l'espace et dans le temps à l'intérieur d'une cellule.

a) Mobilisation du calcium séquestré

La concentration en calcium dans le reticulum endoplasmique (**RE**) est de un à plusieurs ordres de grandeur (10^{-3} M) plus élevée que dans le cytosol (10^{-7} M). Pour maintenir cette différence de concentration et faire face à une fuite passive selon le gradient de concentration, la membrane du RE comporte une pompe à activité Ca^{2+} -ATPasique bloquée par la thapsigargine. De plus, à l'intérieur de cette structure, le calcium est séquestré par des molécules de calréticuline qui le lie avec une grande affinité (Treves et al., 1990).

Le rôle le mieux connu de l' IP_3 est de libérer le calcium séquestré dans le RE en agissant sur un récepteur-canal dont l'identification et l'analyse fonctionnelle ont été réalisées au cours des dernières années. Le récepteur de l' IP_3 est un tétramère qui possède une activité de type canal ionique. Fonctionnellement, la fixation d' IP_3 sur les sites de liaison entraîne l'ouverture du canal, permettant la mobilisation du calcium séquestré, provoquant des fluctuations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ suite à un changement conformationnel (revu dans Berridge et Irvine, 1989). Des phosphoinositides phosphatases spécifiques dégradent rapidement le ligand et mettent fin au stimulus

initial (Blackmore et Exton, 1986; Berridge, 1993). Cependant, la réponse cellulaire à l'IP₃ n'est pas uniforme puisque la mobilisation du calcium comporte des variations spatiales et temporelles. La réponse à l'IP₃ peut être modulée par différents facteurs et résulte en grande partie du rétrocontrôle de l'activité du récepteur de l'IP₃ dans laquelle le calcium prend une place importante (Claret et Mauger, 1994). Le calcium peut régler sa propre libération à partir des réserves sensibles à l'IP₃. Cet effet régulateur de la concentration du calcium intracellulaire est biphasique, de petites élévations de la [Ca²⁺]_i (inférieure à 300 nM) augmentent la réponse à l'IP₃, alors que des concentrations plus élevées sont inhibitrices (Marshall et Taylor, 1993). Les mécanismes de ces effets biphasiques ne sont pas connus et l'emplacement exact du ou des sites pour le calcium sur le récepteur restent à être précisés. Les variations spatiotemporelles de la [Ca²⁺]_i peuvent aussi être expliquées par une amplification de la réponse par le calcium à différents niveaux. Premièrement le calcium pourrait exercer un effet rétropositif sur la PLC et ainsi provoquer des vagues de production d'IP₃ (Myer et Stryer, 1991), qui à son tour provoquerait des vagues de calcium. Un autre mécanisme pour expliquer les variations spatiotemporelles de calcium serait le modèle "calcium-induced calcium release" (CICR) proposé par le groupe de Berridge (Berridge, 1990). Dans ce modèle, le calcium initialement libéré des réserves sensibles à l'IP₃ stimule la libération du calcium des réserves insensibles à l'IP₃ provoquant ainsi des vagues de calcium. Ce processus continue jusqu'à ce qu'un certain niveau de calcium intracellulaire soit atteint et exerce un effet inhibiteur sur le récepteur/canal. La capacité des agents mobilisateurs de calcium pour induire les fluctuations dans la

$[Ca^{2+}]_i$ a été démontré dans différents types cellulaires incluant les hépatocytes de rat (Woods et al., 1986).

b) Mécanismes régissant l'influx de calcium

Il a été montré que les effets métaboliques induits par les agents mobilisateurs de calcium sont atténués lorsque le calcium est enlevé du milieu extracellulaire (Bygrave et Benedetti, 1993). L'influx de calcium joue donc un rôle important dans la réponse cellulaire soutenue à ces agents. La deuxième phase d'augmentation de calcium cytosolique suite à la libération par l' IP_3 du calcium séquestré dans le RE, dépend d'une entrée plus soutenue de cet ion à partir du milieu externe probablement à travers des canaux ioniques membranaires (Mauger et Claret, 1988). Le mécanisme qui régit l'activation de cette voie d'entrée de calcium est controversé. Trois hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes impliqués dans cet influx de calcium. Une première hypothèse voudrait qu'un métabolite soluble (IP_3 ou IP_4) soit responsable du contrôle de l'influx calcique (Hansen et al., 1991) et que peut être il existe un lien direct entre le récepteur à l' IP_3 et le canal au niveau de la membrane plasmique (Irvine, 1990, 1991). La seconde, est le couplage direct entre le récepteur et le canal calcique membranaire via une protéine G (Hansen et al., 1991; Berven et al., 1994). La troisième hypothèse appelée le modèle d'entrée capacitative ("capacitative calcium entry") où la vidange des réserves intracellulaires de calcium stimule l'influx de calcium (Putney, 1997) (figure 8).

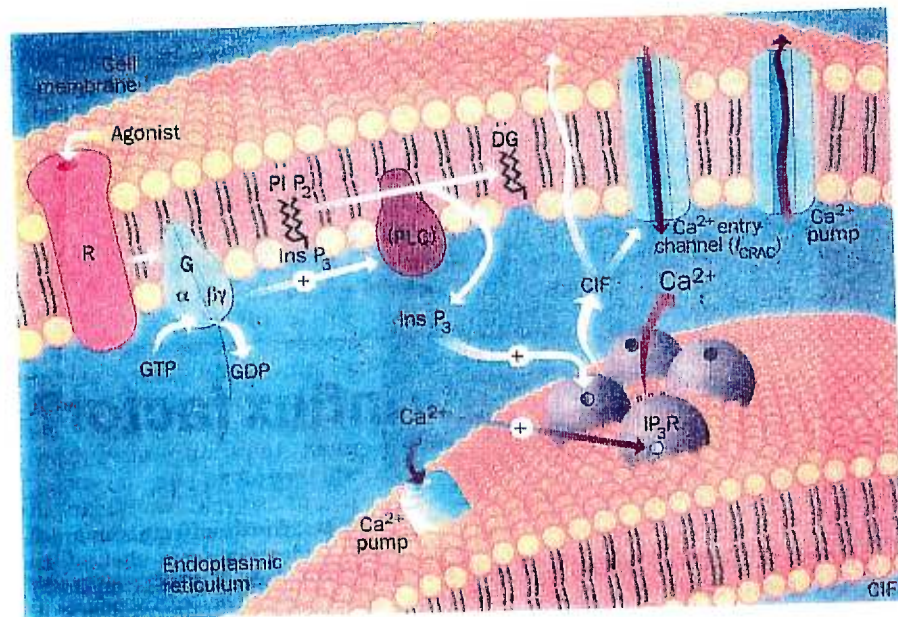


Figure 8. Le modèle d'entrée capacitative de calcium et l'action du CIF.

L'InsP₃ induit la mobilisation des réserves intracellulaires de calcium en se liant à un récepteur spécifique sur le RE. L'épuisement de ces réserves induirait le relâchement du CIF du RE et celui-ci stimulerait l'influx de calcium via ICRAC. PLC, phospholipase C; PIP₂, phosphatidylinositol bisphosphate; InsP₃, inositol trisphosphate; IP₃R, récepteur à l'inositol trisphosphate; CIF, calcium influx factor, ICRAC, Ca²⁺-release-activated current. (Clapham, 1993)

Ce dernier modèle semble être un mécanisme général qui s'applique à l'action des différents agonistes. En plus, cet influx peut aussi être stimulé en présence d'un ionophore à calcium, l'ionomycine et aussi par la thapsigargine, dans divers types cellulaires incluant les hépatocytes (Llopis et al., 1992). Contrairement aux autres canaux, rien n'est connu sur la possibilité de moduler physiologiquement cette voie d'entrée de calcium. Les voies d'entrée du calcium extracellulaire ont fait l'objet d'études intensives mais aucun canal calcique n'a été purifié ou cloné chez les cellules non-excitables. Un courant calcique membranaire activé par la vidange des compartiments intracellulaires a été caractérisé et nommé Icrac (calcium-release-activated-channel). Il a tout d'abord été identifié dans les lymphocytes et les mastocytes (Hoth et Penner, 1992; Hoth et al., 1993). La caractérisation moléculaire de ce canal constituera une étape importante dans la validation de l'hypothèse du flux entrant capacitatif. Cependant, les signaux impliqués dans la stimulation de Icrac suite au vidangage des réserves intracellulaires de calcium font encore l'objet de recherches intensives. La participation d'une protéine liant le GTP (Fasolato et al., 1993; Bird et Putney, 1993) et d'un messenger phosphorylé qui diffuserait à travers le cytosol vers la membrane plasmique (Randriamampita et Tsien, 1995) ont été rapportés. Randriamampita et Tsien.(1995) ont isolé un messenger de faible poids moléculaire à partir de cellules Jurkat qu'ils ont appelé CIF (calcium influx factor); il serait libéré du RE et activerait l'influx de calcium dans divers cellules nonexcitables. Il n'est pas connu si CIF active Icrac ou un autre type de canal calcique. D'autres messagers pourraient aussi être impliqués dans l'activation de cet influx calcique (revu dans Parekh et Penner, 1997).

c) Les voies d'entrée du calcium dans les cellules hépatiques

Les hépatocytes possèdent de multiples voies qui contrôlent indépendamment l'entrée de calcium durant la stimulation des récepteurs liés à la PLC. De plus, au niveau du foie l'influx de calcium peut être stimulé en vidant les réserves intracellulaires artificiellement à l'aide de la thapsigargine. Les voies d'entrée du calcium vers le cytosol des cellules hépatiques sont sujettes à des recherches intensives. Dans ces cellules, il n'y a pas d'évidences pour la présence de canaux calciques activés par le voltage, que cela soit par des expériences fonctionnelles (Mauger et Claret, 1988) ou au niveau de l'ARNm (Hughes et al., 1993). Malgré l'absence de canaux calciques voltage-dépendants dans les cellules hépatiques, plusieurs travaux ont observé des effets des bloqueurs de canaux calciques tel que le vérapamil (Striggow et Bohnensack, 1993) pour lesquels les cellules possèdent des sites de liaison de faible affinité (Ioannoni et al., 1991). On pense donc que les effets de ces agents sont largement non spécifiques.

D'autre part, des études récentes ont démontré la présence de canaux cationiques non sélectifs (CCNS) à la surface des hépatocytes primaires de rat et sur la lignée cellulaire HTC (Lidofsky et al., 1993). Ces canaux permettent l'entrée des ions Na^+ , K^+ , et Ca^{2+} . Ils ont une conductance approximative de 30 pS et sont indépendants du potentiel membranaire et du pH cytosolique. Leur probabilité d'ouverture est une fonction saturable de la concentration du calcium intracellulaire (Fitz et al., 1994; Lidofsky et al., 1997). Ces canaux sont activés par le calcium intracellulaire et inhibés par la PKC (Fitz et al., 1994). Ils s'ouvrent rapidement

après stimulation avec les agonistes couplés aux protéines Gq et sont responsables de la dépolarisation initiale rapide du potentiel membranaire induit par les agonistes purinergiques (ATP) dans les cellules hépatiques (Fitz et Sostman, 1994). D'autres expériences ont démontré que les CCNS sont inhibés par le nickel, le SKF 96365 et le gadolinium, mais non par le vérapamil (Lidofsky, 1995). L'ensemble de ces propriétés indiquent que ces canaux peuvent participer dans la phase soutenue de la réponse calcique induite par les agonistes couplés aux protéines Gq et dans l'entrée de calcium induite par la déplétion des réserves par la thapsigargine. En effet, les voies d'entrée de calcium dans les hépatocytes sont sensibles au nickel, aux lanthanides tel que le gadolinium et au SKF 96365 (Crofts et Barritt, 1990; Fernando et Barritt, 1994). Les CCNS présents dans la membrane des hépatocytes et des cellules HTC pourraient être des candidats responsables de l'influx de calcium induit par les agonistes des RCPG (Lidofsky et al., 1993, Fernando et Barritt, 1995). Une autre étude a aussi détecté un faible courant sélectif au calcium dans les hépatocytes de rat en culture (Duszynski et al., 1995) qui est activé par les agonistes couplés à la protéine Gq ou induit par la thapsigargine et dont les propriétés rappellent partiellement celles de Icrac dans les autres cellules. Il est donc évident que malgré les énormes progrès, les voies d'entrée du calcium surtout au niveau hépatique sont loin d'être complètement élucidées.

Il existe des évidences que les canaux calciques des membranes plasmiques hépatiques soient couplés à des récepteurs via une protéine G sensible à la toxine pertussique. Dans des hépatocytes isolés, l'action de la phényléphrine et de la

vasopressine sur l'influx de calcium ainsi que celle de la phényléphrine sur la néoglucogénèse et la glycolyse était abolie en présence de la toxine pertussique (Butta et al., 1993). D'autres ont démontré que des anticorps contre $G_{i\alpha_2}$ inhibent non seulement l'influx de calcium induit par la vasopressine mais également l'action de la thapsigargine. Ceci suggère que G_i pourrait également être impliquée dans la stimulation de l'influx par la vidange des réserves intracellulaires de calcium (Berven et al., 1995).

3.3- MÉCANISME D'ACTIVATION, DE RÉGULATION ET D'ACTION DE LA PROTÉINE KINASE C

Les PKCs sont des médiateurs majeurs des signaux extracellulaires tels que les facteurs de croissance, les hormones et les neurotransmetteurs. Ce sont aussi des régulateurs importants de la croissance, de la différenciation et du métabolisme cellulaire. Des études biochimiques et structurales révèlent qu'elles appartiennent à une famille multigénique comprenant des isoformes, classées dans trois sous-familles différentes. Le groupe des PKCs conventionnelles (cPKCs) comporte quatre sous-types : α , βI , βII et γ , qui sont dépendants du calcium. Les PKCs non-conventionnelles (nPKCs, dont les sous-types sont: δ , ϵ , η et θ) sont insensibles au calcium, mais comme les cPKCs sont régulées par les phospholipides et le DAG. Les PKCs atypiques (aPKCs, les sous-types sont: ζ , λ et ν) ne dépendent ni du calcium, ni du DAG (Ohno et al., 1991; Nishizuka, 1992; Dekker et Parker, 1994) et leur mode d'action n'est pas clairement établi. Contrairement au cPKCs et

nPKCs, les aPKCs ne sont pas sensibles aux esters de phorbol (promoteurs tumoraux qui activent directement la PKC). La discussion qui suit sera limitée aux mécanismes d'activation et de régulation des cPKCs.

a) Activation des cPKCs

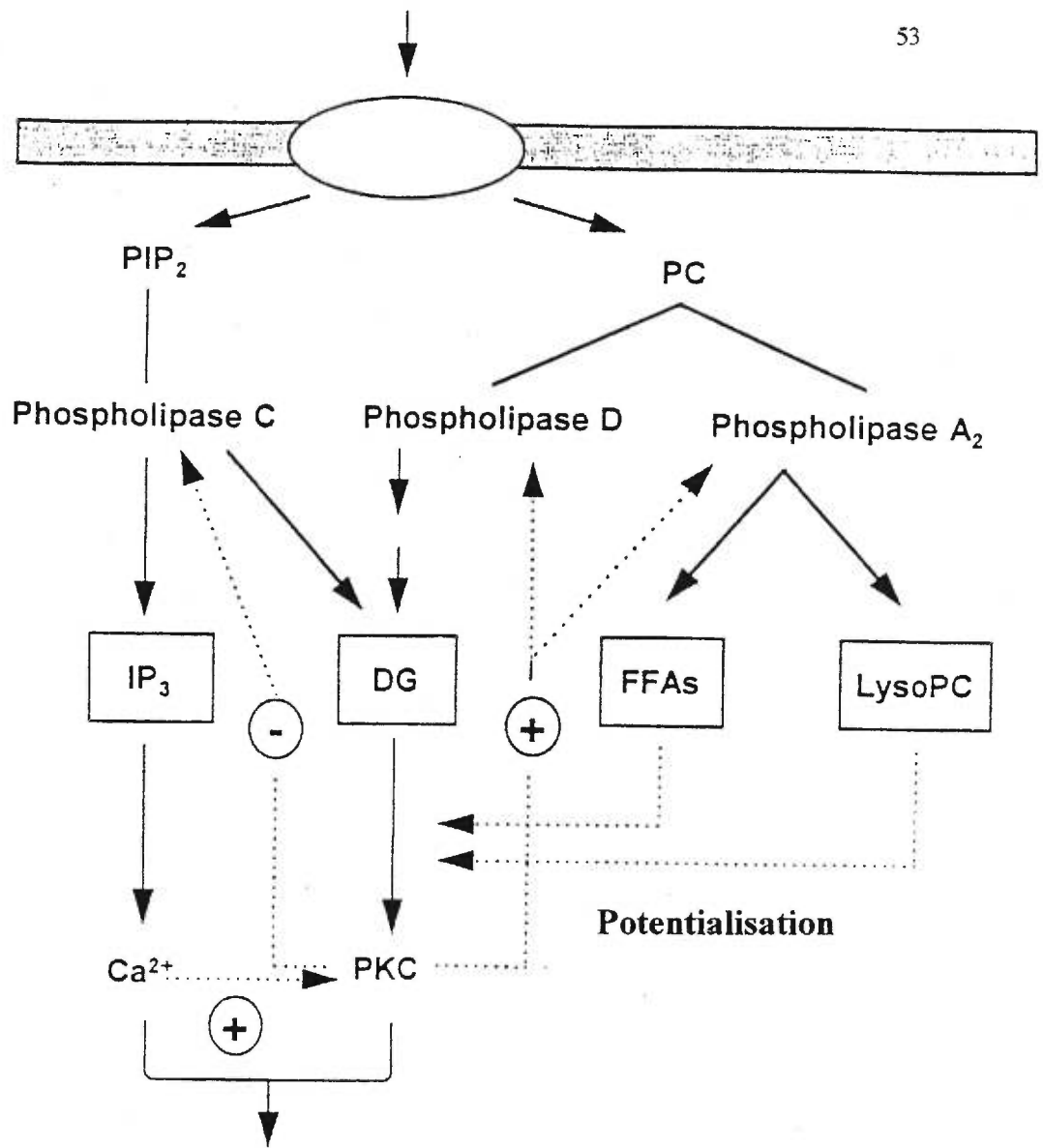
L'activation des cPKCs se fait selon un processus complexe. En premier lieu, suite à la stimulation de la PLC, le calcium mobilisé des réserves intracellulaires en réponse à l' IP_3 favorise l'insertion membranaire de la PKC inactive présente dans le cytoplasme ou faiblement associée à la membrane plasmique. Ce déplacement entraîne sa rencontre avec ses autres coactivateurs, la phosphatidylsérine (PS) et le DAG. Le DAG induit ensuite un changement conformationnel rendant ainsi l'enzyme active. Des interactions positives entre le DAG et le calcium indiquent clairement la coopérativité d'effets des deux seconds messagers (DAG et l' IP_3) pour induire la translocation et l'activation de la PKC à la membrane plasmique (Wolf et al., 1985). Puisque le DAG rend la PKC plus sensible au calcium, l'influx de calcium subséquent joue probablement un rôle important dans l'activation soutenue de la PKC. L'activation de cette dernière dépend d'une production biphasique de DAG. La première phase est due à l'hydrolyse du PIP_2 par la $PLC\beta$ et ne compte que pour une production transitoire du DAG. Par la suite, la PKC stimule une deuxième phase de production de DAG due à l'hydrolyse du phosphatidylcholine par la phospholipase D (PLD) (Nishizuka, 1992). Dans les hépatocytes, la stimulation de la PLD provoque l'hydrolyse de phosphatidylcholine et celle-ci est dépendante du calcium (Siddiqui et Exton, 1992). Cette deuxième

phase serait dépendante à la fois du calcium et de la PKC elle-même qui a donc un effet rétro-positif sur son activation en prolongeant la production de DAG (figure 9)

La mesure directe de l'activité des isoformes de la PKC est très difficile du fait que leurs propriétés sont très semblables. De ce fait les mécanismes précis d'activation ne sont toujours pas bien connus. L'utilisation des esters de phorbol et d'inhibiteurs spécifiques ont permis de mettre en évidence le rôle de ces enzymes dans le métabolisme du glycogène hépatique (Roach et Goldman, 1983; Fain et al., 1984). Dans le foie, Il a été montré que la PKC contrôle négativement la GS (inactivation) (Pugazhenthii et Khandelwal, 1995). Les esters de phorbol ont un effet activateur qualitativement et quantitativement différent de celui du DAG en particulier dans la mesure où ces derniers produisent une activation permanente alors que l'action du DAG est brève. La désensibilisation des PKCs est rarement obtenue par des stimuli physiologiques alors qu'elle est observée couramment à la suite d'un traitement prolongé avec les esters de phorbol. Une désactivation des PKCs peut aussi survenir suite à une autophosphorylation se réalisant au niveau N- et C-terminal de ces protéines.

b) Mécanismes de désensibilisation par la PKC

La PKC joue aussi un rôle important dans le dialogue entre les différents systèmes de signalisation. Des études ont démontré son intervention dans le processus de désensibilisation de la voie dépendante de l'AMPc et implique la phosphorylation de



Réponses cellulaires

Figure 9. Mécanismes d'activation de la PKC. La PKC est initialement activée par le DAG libéré à partir de l'hydrolyse du PIP₂. Par la suite la PKC stimule une deuxième phase de production de DAG due à l'hydrolyse du phosphatidylcholine par la phospholipase D. La PKC stimule également la phospholipase A₂ menant à la libération d'acides gras libres insaturés et de lysophosphatidylcholine qui potentialisent l'effet du DAG. PIP₂: Phosphatidylinositol bisphosphate, PC: phosphatidylcholine, PKC: protéine kinase C, FFAs: acides gras insaturés, PI₃: inositol trisphosphate, LysoPC: lysophosphatidylcholine, DAG: diacylglycérol. (Nishizuka, 1992).

diverses composantes de cette voie de signalisation (le récepteur, la protéine Gs et l'adenylyl cyclase). Au niveau hépatique, la vasopressine et l'angiotensine II pourraient inhiber la production de l'AMPc induite par le glucagon et l'épinéphrine en activant la PKC (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1982; van de Werve et al., 1983). L'effet se produirait soit au niveau de la protéine Gs (Hernandez-Sotomayor et al., 1988) soit au niveau de l'adenylyl cyclase (Morgan et al., 1983). Donc la PKC serait impliquée dans la régulation de la production de l'AMPc et des effets métaboliques induits par le glucagon tel que l'activation de la phosphorylase. Au niveau du foie, le contrôle hormonal de la production hépatique de glucose se fait non seulement par l'AMPc mais également via une augmentation de calcium intracellulaire. La PKC peut aussi jouer un rôle important dans le processus de désensibilisation de la voie dépendante du calcium en agissant à différents niveaux, soit au niveau du récepteur en le phosphorylant et en diminuant son affinité pour le ligand, comme c'est le cas pour le récepteur α_1 -adrénergique (Corvera et al., 1986; Bouvier et al., 1987), soit en modulant l'activité de la PLC (Rhee et al., 1991) ou d'une protéine Gq (Blackmore et Exton, 1986). Récemment, il a été montré que la préincubation des hépatocytes en présence de la dexfenfluramine (Dexf) inhibe l'activation de la phosphorylase en réponse aux agents α_1 -adrénergiques (Comte et al., 1997). D'autre part, plusieurs études postulent que la PKC jouerait un rôle important dans la désensibilisation des systèmes de transduction dépendants du calcium. Il a été montré que le PMA (ester de phorbol) contrecarre les effets de la phényléphrine sur la mobilisation de calcium (Cooper et al., 1985) dans les hépatocytes. Ceci suggère que la PKC est responsable de la désensibilisation des

effets α_1 -adrénergiques. Par ailleurs la Dexf semble agir via l'activation de la PKC suite à sa liaison au récepteur α_1 -adrénergique (Comte et al., 1997) et dont l'effet serait sur la protéine Gq.

Il est connu que l'insuline stimule l'activité PKC dans les hépatocytes de rat (Cooper et al., 1990). Cependant, les isoformes spécifiques impliquées dans cette réponse ne sont pas clairement établis dans ces cellules. Il a été montré que les hépatocytes de rat expriment cinq isoformes de PKC : α , β , δ , ϵ et ξ . D'autres chercheurs ont montré des altérations dans la famille des cPKC (α , β I, β II, γ) dans les hépatocytes isolés de rat rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine (Tang et al., 1993; Croquet et al., 1996) et ceux provenant de rat génétiquement obèses (van de Werve et al., 1987; Garcia-Sainz et al., 1992). Donc, certaines isoformes de PKC peuvent jouer un rôle dans la transduction du signal de l'insuline dans les cellules hépatiques dans des conditions physiologiques et pathophysiologiques, et aussi dans l'antagonisme métabolique entre les hormones.

L'insuline agissant via un RTK et les catecholamines via un RCPG ont des actions opposées sur le métabolisme cellulaire des lipides et des glucides. Comment ces deux classes de récepteurs interagissent au niveau cellulaire n'est pas clair. Il a été montré que l'insuline entraîne la phosphorylation des tyrosines du récepteur β_2 -adrénergique. Ceci atténue l'activation de la voie adénylyl cyclase (Hadcock et al., 1992). La phosphorylation des tyrosines du récepteur β_2 -adrénergique peut se faire soit à travers la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline lui-même, ou par une autre tyrosine kinase. D'un autre côté, l'insuline antagonise les effets α_1 -adrénergique

dans le foie. Il a été montré que l'insuline diminue l'augmentation de calcium cytosolique induite par la phényléphrine (Dehaye et al., 1981) et inhibe l'activation de la phosphorylase dans les hépatocytes isolés de rat (van de Werve et al., 1977). D'autres auteurs, ont montré que l'insuline et des anti-diabétiques synthétiques (metformine et phenphormine) inhibent les oscillations de calcium induites par les agents α_1 -adrénergiques dans les cellules hépatiques en culture (Somogyi et al., 1992; Ubl et al., 1994). Mais le mécanisme impliqué dans cette action n'est toujours pas bien défini. De plus, il n'est pas connu si cette action nécessite l'activité PKC.

3.4- ACTIVATION DE LA MAPK PAR LES AGENTS MOBILISATEURS DE CALCIUM

De multiples voies de signalisation activent la MAPK et dépendent ou non de Ras, des PKCs ou de Raf. La spécificité de la réponse peut avoir différentes conséquences physiologiques en fonction du couplage à différents effecteurs, et en fonction du type de tissu et de la durée de l'activation de la MAPK. Par exemple, dans les cellules PC12 (cellules de type neuronal), une activation transitoire induit une croissance cellulaire tandis qu'une activation soutenue mène à la différenciation des cellules.

La stimulation de la MAPK par les RCPG peut être transmise soit par un mécanisme qui implique PKC ou indépendant de cette dernière. Dans les cellules COS-7, l'activation de la MAPK par les récepteurs α_2 -adénergiques couplés à la

protéine Gi se fait à travers l'activation de Ras et via le complexe G $\beta\gamma$ qui phosphoryle la protéine Shc sur des résidus tyrosines (Koch et al., 1994; Hawes et al., 1995). Bien que le complexe G $\beta\gamma$ soit capable de stimuler la PLC β , l'activation de la MAPK par les récepteurs α_2 -adrénergiques se fait par un mécanisme indépendant de la PKC. Ceci n'est pas le cas pour le récepteur α_1 -adrénergique couplé à Gq qui, dans des cellules prétraitées au PMA pendant 24 heures (régulation à la baisse des isoformes de PKC sensibles au PMA), est incapable d'activer la MAPK (Hawes et al., 1995). Dans les lymphocytes T, la PKC stimule la formation du complexe Ras-GTP (Downward et al., 1990). D'autres ont montré que la PKC est capable de phosphoryler et d'activer Raf in vitro et in vivo (Sozeri et al., 1992; Carroll et May, 1994) et peut donc activer la MAPK dans un extrait cellulaire d'oocytes (Van Renterghem et al., 1994). Ainsi la PKC peut activer la MAPK soit à travers Ras ou à travers Raf. D'autres auteurs ont montré que la PKC peut activer la MAPK soit par un mécanisme dépendant de Raf ou via l'activation de la MEKK, qui est réputée comme étant impliquée dans la régulation de la cascade MAPK par les protéines G hétérotrimériques (Lange-Carter et al., 1993). Une voie dépendante plutôt du calcium que de la PKC est impliquée dans l'activation de la MAPK induite par l'angiotensine II dans les myocytes. La désensibilisation de la PKC par un traitement prolongé au PMA ainsi que l'utilisation de trois classes d'inhibiteurs de PKC n'ont pas d'effet sur l'activation de la MAPK induite par l'angiotensine II (Sadoshima et al., 1995). De plus, il a été montré que l'influx de calcium mène à la stimulation de la cascade MAPK via l'activation de Ras dans les cellules PC12 (Rosen et al., 1994; Rusanescu et al.,

1995). Ceci peut être médié par une tyrosine kinase récemment clonée (PyK2) qui est activée en réponse à l'augmentation de calcium intracellulaire et à l'activation de la PKC (Lev et al., 1995). Il est clair que le calcium peut moduler la voie de la MAPK, mais les mécanismes précis ne sont pas clairement établis. Un des mécanismes par lequel l'élévation du calcium intracellulaire règle les événements cellulaires, serait à travers son association avec la calmoduline (CaM). Le complexe Ca^{2+} -CaM se lie et module le fonctionnement de multiples protéines incluant la famille des CaM kinases. Enslin et al. (1996) ont montré que la cascade CaM kinase peut activer la MAPK. Donc, selon le type de cellules et l'agoniste utilisés, l'activation de la MAPK par les protéines Gq peut se faire selon des mécanismes variés.

Au niveau hépatique, l'activation de la MAPK peut être transmise par les agonistes mobilisateurs de calcium et celle-ci dépend à la fois du calcium et de la PKC. Par contre, il semble exister un autre mécanisme qui est seulement dépendant du calcium. Romanelli et van de Werve (1997) ont montré que la MAPK peut être activée par la vasopressine et par un effet α_1 -adrénergique de la norépinephrine (NE) suggérant que dans le foie, la MAPK peut être stimulée par un mécanisme transmis par Gq. Dans cette même étude, la préincubation des hépatocytes en présence de RO 31-8220 (inhibiteur de PKC) bloque complètement l'activation de la MAPK par la NE et la vasopressine suggérant que la PKC est nécessaire pour cette activation. En plus, le PMA seul provoque une activation soutenue de la MAPK. En présence d'EGTA, l'influx de calcium est aboli et l'activation de la

MAPK par la NE et la vasopressine est également empêchée. Donc, le calcium est également requis pour l'activation de la MAPK. Ceci pourrait être expliqué par un besoin d'influx de calcium pour une activation soutenue de la PKC (Rasmussen et al., 1995). Romanelli et van de Werve (1997) ont aussi montré que le signal calcique seul est suffisant pour induire l'activation de la MAPK. La thapsigargine et l'ionomycine, deux agents qui induisent l'augmentation du calcium intracellulaire sans faire intervenir la cascade de seconds messagers, provoquent chacun une activation de la MAPK, tel que rapporté aussi dans d'autres études (Chao et al., 1992; Huang et al., 1995). Cependant, le mécanisme précis impliqué dans cette action du calcium demeure inconnu. D'autres auteurs ont montré que les RCPG tels que les récepteurs de la vasopressine et l'angiotensine II, activent la MAPK dans les hépatocytes. Cependant, une activation complète de la MAPK semble nécessiter la présence d'une protéine G sensible à la toxine pertussique. (Melien et al., 1998).

La cascade Ras/Raf/MAPK se situe à un point de convergence de nombreux signaux, parfois complètement antagonistes. Par exemple, les récepteurs couplés aux protéines G_i activent cette voie en favorisant la formation de Ras-GTP. En revanche, les facteurs qui activent l'adénylyl cyclase ou inhibent les phosphodiésterases, bloquent cette voie. Ils provoquent une élévation du taux intracellulaire d'AMPc, une activation de PKA responsable d'une phosphorylation de Raf, l'empêchant ainsi de se lier à Ras. Ce mécanisme pourrait expliquer les effets antagonistes de l'insuline et de l'AMPc dans les tissus cibles de l'insuline

(Burgering et Bos,1995). Cependant, rien n'est connu sur les effets antagonistes de l'insuline et des agents mobilisateurs de calcium à ce niveau.

IV- APPROCHE ET BUT DU TRAVAIL

Il a été montré que l'insuline augmente la $[Ca^{2+}]_i$ dans divers types cellulaires (Draznin et al., 1987a, 1987b; Touyz et Schiffrin, 1994). Cependant, son effet direct sur le calcium hépatocellulaire n'a pas été bien étudié. D'autre part, il a aussi été montré que l'insuline amenait plus souvent un ralentissement des oscillations du calcium cytosolique induit par un agent α_1 -adrénergique. Les auteurs suggéraient que cet effet de l'insuline participerait à l'antagonisme métabolique des catécholamines (Somogyi et al., 1992). L'objectif principal de cette thèse vise à vérifier deux hypothèses principales qui sont les suivantes:

a- L'insuline exerce un effet direct sur le calcium hépatocellulaire

b- L'élévation du calcium cytosolique induite par l'insuline sous-tend un mécanisme d'antagonisme envers les agonistes cataboliques mobilisateurs de calcium dans les cellules hépatiques.

a.1 Étude de l'effet direct de l'insuline sur le calcium hépatocellulaire

Plusieurs évidences supportent un rôle pour le calcium extracellulaire dans différentes réponses physiologiques de l'insuline au niveau hépatocellulaire (Rogers et al., 1991, Irvine et al., 1993). Une étude préalable a montré que l'insuline augmente le calcium cytosolique dans les hépatocytes perméabilisés à la digitonine à l'équilibre (Strunicka, 1985). Cependant, aucune étude mesurant directement les variations de calcium en réponse à l'insuline n'a été faite dans des cellules hépatiques entières. Nous avons ainsi vérifié l'effet direct de l'insuline sur le calcium

hépatocellulaire. Nous avons aussi évalué l'importance du calcium extracellulaire dans l'action de l'insuline en présence d'EGTA et en absence de calcium. La mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ est déterminée par microspectrofluorimétrie dans des doublets d'hépatocytes isolés de rat et mis en culture à court terme. En effet, les hépatocytes en culture à court terme sont des cellules non transformées et s'approchent du modèle *in vivo*. De plus, le modèle de doublet d'hépatocytes (Gautam et al., 1987) maintient deux hépatocytes adjacents dans une configuration plus proche de celle observée *in situ* et représente un modèle *in vitro* où la polarité épithéliale (Graf et al., 1984) et le couplage électrique et ionique (Graf et al., 1987) sont maintenus. En effet, la présence de canalicules biliaires a été décrite dans les doublets d'hépatocytes de rat comme un indice du maintien de la polarité cellulaire (pôle basal et pôle sécrétoire) (Gautam et al., 1987).

Dans ce travail, les hépatocytes de rat sont isolés par la méthode de perfusion du foie à la collagénase (Haimovici et al., 1994) et purifiés par centrifugation sur gradient de Percoll. La variabilité des cellules (exclusion du bleu de trypan) dépasse les 85 % . Les cellules isolées sont mises en culture à court terme (1 heure) sur des lamelles de verre rondes. Elles sont ensuite chargées avec la sonde fluorescente, le fura-2AM très liposoluble (les estérases cytosoliques libèrent ensuite la forme ionisée de la sonde qui émet un signal fluorescent en fonction de la concentration de l'ion Ca^{2+}) et déposées par la suite dans un bain de perfusion fixé sur la platine d'un microscope inversé. La mesure du signal fluorescent consiste en l'excitation lumineuse d'un doublet d'hépatocytes (cellules adhérentes sur lamelle de verre recouverte de

collagène) à deux longueurs d'ondes et la mesure de la lumière émise à une seule longueur d'onde. Le rapport des signaux émis après excitation aux deux longueurs d'onde donne un indice direct de la concentration ionique qui est indépendante de la concentration de la sonde et donc des phénomènes de fuite ou de changement de volume cellulaire. Une calibration intracellulaire in situ est faite à l'aide d'un ionophore pour le calcium, l'ionomycine.

a.2 Déterminer le profil pharmacologique de l'influx de calcium induit par

l'insuline

Les résultats obtenus suite à la vérification du premier objectif nous ont conduit à soumettre l'hypothèse selon laquelle l'insuline augmente la $[Ca^{2+}]_i$ en induisant un influx de calcium probablement à travers des CCNS. Récemment, des CCNS ont été décrits à la surface des cellules primaires d'hépatocytes de rat et sur les cellules HTC (Lidofsky et al., 1993). Ils sont insensibles aux vérapamil et sont bloqués par le nickel, le gadolinium et le SKF 96365 (Lidofsky, 1995). Nous avons donc pensé que les CCNS seraient une cible possible de l'insuline. Pour cette étude, nous avons utilisé des bloqueurs de canaux calciques qui sont le vérapamil, le nickel et le gadolinium pour déterminer le profil pharmacologique de l'influx calcique induit par l'insuline. Nous avons mesuré les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ (comme décrit dans la section précédente) en réponse à l'insuline, en présence et en absence de chacun des inhibiteurs.

a.3 L'influx de calcium induit par l'insuline joue un rôle dans les voies de signalisation cellulaire de l'insuline plus particulièrement la voie MAPK et la voie PI3-K

Le calcium joue un rôle dans l'activation de la MAPK dans divers types cellulaires (Chao et al., 1992; Rosen et Greenberg, 1996; Sadoshima et al., 1995) incluant celles du foie (Romanelli et van de Werve, 1997). Romanelli et van de Werve. (1997) ont montré que l'activité MAPK hépatocellulaire stimulée par les agonistes mobilisateurs de calcium et par la thapsigargine et l'ionomycine était inhibée par la chélation du calcium extracellulaire en présence d'EGTA. L'influx de calcium pourrait donc être impliqué dans les effets de l'insuline dans le foie puisque cette dernière active la MAPK. D'autre part, étant donné l'importance de la voie PI3-K dans la cascade de signalisation de l'insuline, nous avons aussi évalué le rôle de l'influx de calcium au niveau de cette seconde voie majeure intervenant dans divers effets physiologiques de l'insuline. Le troisième objectif de cette étude est de vérifier l'effet de la chélation du calcium par l'EGTA ainsi que l'effet des bloqueurs de canaux calciques (vérapamil, nickel et gadolinium) sur l'activation de la voie MAPK et celle de la PI3-K, ainsi que leur effet sur la phosphorylation de l'IRS-1 et de la sous-unité β du récepteur à l'insuline.

Ces études ont été conduites sur des hépatocytes isolés de rat et mis en culture à court terme et soumises ensuite aux mêmes conditions qu'aux études en fluorescence. La MAPK et la PI3-K sont immunoprécipitées dans le lysat cellulaire par des anticorps spécifiques contre chacune des enzymes (p44^{mapk}-antiseum SM1

et anti-p85 respectivement). L'activité MAPK est déterminée suite à la phosphorylation du substrat MBP (Myelin basic Protein) avec du γ - ^{32}P (ATP). Après migration sur gel d'électrophorèse, les bandes correspondantes au MBP marqué sont coupées et la radioactivité quantifiée. L'activité PI3-K est déterminée suite à la phosphorylation du PI (phosphatidylinositol) en PIP (phosphatidylinositol phosphate) avec du γ - ^{32}P (ATP), les lipides marqués sont séparés par chromatographie sur couche mince et quantifiés par phosphorimager. L'IRS-1 et la sous-unité β du récepteur à l'insuline sont immunoprécipités par des anticorps anti-IRS1 et anti- β subunit et la phosphorylation sur les résidus tyrosines est mesurée par des anticorps antiphosphotyrosines.

b.1 Étude de l'effet interactif entre l'insuline et l'ATP

D'après les résultats de l'article 1, l'insuline augmente le calcium intracellulaire en provoquant un influx de calcium dans les doublets d'hépatocytes isolés de rat. Cette action est importante pour coupler le récepteur tyrosine kinase de l'insuline à l'activité MAPK. D'autres études de notre laboratoire ont aussi montré que l'insuline et l'ATP augmentent la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules HTC probablement en activant des CCNS (Mathé et al., 1997). Nous avons donc étudié l'implication de l'influx de calcium dans l'effet interactif entre l'insuline et l'ATP au niveau membranaire et intracellulaire. En effet, ces études ont été conduites sur les cellules HTC. Ces cellules ont été choisies par ce qu'elles expriment des CCNS très similaires à ceux retrouvés sur des hépatocytes de rat en culture. Les cellules HTC possèdent aussi les voies de signalisation cellulaire à l'insuline (Sung et al., 1994). De plus, cette lignée cellulaire est stable et avantageuse pour des études d'électrophysiologie et de fluorescence (Lidofsky et al., 1995).

Dans cette étude, l'insuline est administrée avant et pendant l'administration subséquente de l'ATP. L'interaction au niveau membranaire est déterminée par des mesures de fluorescence (comme décrit dans la section a.1) et par la technique de patch clamp en mode whole-cell qui permet la mesure des courants cellulaires. Cette technique permet de mesurer les fluctuations de courants engendrés par des canaux ioniques *in situ*. Les cellules HTC adhérentes sur des lamelles de verre rondes sont placées dans un bain de perfusion fixé sur la platine d'un microscope inversé et l'étude est faite sur une seule cellule. Cette méthode permet d'isoler une infime partie de la membrane cellulaire en pressant sur la surface externe d'une cellule une pipette de verre dont la pointe a été préalablement polie par chauffage. Les courants sont mesurés à l'aide d'un amplificateur EPC-7 et du logiciel PClamp. Les données sont sauvegardées sur le disque dur ou sur ruban magnétique après digitalisation et analysées subséquemment avec le même logiciel.

L'interaction au niveau intracellulaire est étudiée par immunoprécipitation de la MAPK en utilisant un anticorps spécifique (phospho-specific p44/42 MAPK). Cet anticorps est choisi par ce qu'il détecte la p44/p42 MAPK (Erk1 et Erk2) seulement lorsqu'elles sont phosphorylées catalytiquement sur la thréonine 202 et la tyrosine 204. Les protéines phosphorylées sont détectées par chemiluminescence et l'intensité des bandes est quantifiée par densitométrie.

V- Articles

5.2 Article 1

Insulin induces Ca^{2+} influx into isolated rat hepatocyte couplets

Par

Kenza Benzeroual, Gérald van de Werve, Sylvain Meloche, Laurence Mathé, Angela Romanelli et Pierre haddad

Publié en 1997

Dans

American Journal of Physiology. 272 : G1425-1432

L'objectif principal de cette étude est d'examiner l'effet direct de l'insuline sur le calcium intracellulaire chez les doublets d'hépatocytes isolés de rat et mis en culture à court terme. Nous avons démontré que l'insuline augmente la $[Ca^{2+}]_i$ de manière monophasique, réversible et dépendante de la dose. Cette augmentation disparaît lorsque le calcium est chélaté par l'EGTA. Ceci suggère que l'insuline stimule un influx de calcium. Pour déterminer le profil pharmacologique de cet influx calcique nous avons utilisé des bloqueurs de canaux calciques. Ainsi, nous avons démontré que le vérapamil n'inhibe pas la réponse calcique à l'insuline alors que le nickel et le gadolinium inhibent fortement l'influx de calcium induit par l'insuline. Conjointement aux résultats obtenus avec l'EGTA et le vérapamil, ce profil pharmacologique est compatible avec l'implication des CCNS dans l'influx de calcium induit par l'insuline. Enfin, nous avons étudié l'effet de cet influx calcique sur l'activation de la voie MAPK, une des principales voies de signalisation de l'insuline. Nous avons trouvé que les conditions expérimentales qui interfèrent avec l'influx de calcium induit par l'insuline (EGTA, nickel et gadolinium) inhibent fortement l'activité de la MAPK induite par l'insuline. Ceci suggère que l'influx de calcium est important pour la stimulation de l'activité MAPK par l'insuline.

INSULIN INDUCES CALCIUM INFLUX INTO ISOLATED RAT HEPATOCTE COUPLETS

Kenza BENZEROUAL^{1,2}, Gérald VAN DE WERVE^{1,3}, Sylvain MELOCHE^{2,5}, Laurence MATHE^{1,2}, Angela ROMANELLI⁴ and Pierre HADDAD^{1,2}

Groupe de recherche en transport membranaire¹, Départements de Pharmacologie², de Nutrition³ et de biochimie⁴, Université de Montréal et Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu de Montréal⁵, Montréal, Québec, CANADA.

SHORT TITLE: Insulin increases intracellular calcium in liver cells

Address correspondance to:
Pierre Haddad, Ph.D.
Groupe de recherche en transport membranaire et
Département de pharmacologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Downtown Station
Montréal (Québec)
CANADA H3C 3J7

Telephone: 514-343-6590
Fax: 514-343-2291
E-mail: haddadpi@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

Isolated rat hepatocyte couplets were used to study the direct effect of insulin on intracellular Ca^{2+} homeostasis. Insulin induced a dose-dependent increase in hepatocellular Ca^{2+} that was gradual, generally monophasic and reversible. Chelation of extracellular Ca^{2+} abolished the insulin-induced Ca^{2+} response and this suppression was not related to an effect on insulin binding as indicated by displacement studies. We thus tested the effect of several Ca^{2+} channel inhibitors on insulin-induced Ca^{2+} influx. Verapamil at 20 or 200 μM was without effect whereas 500 μM nickel and 50 μM gadolinium strongly inhibited insulin-induced Ca^{2+} entry. Finally, we tested whether insulin-induced Ca^{2+} movements were implicated in the stimulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase activity which we measured by an immune-complex assay. Verapamil was without effect on the insulin-dependent stimulation of p44^{mapk} activity whereas addition of EGTA, nickel or gadolinium strongly inhibited the effect of the peptide hormone. Our results indicate that insulin triggers Ca^{2+} influx into hepatocytes, possibly through the opening of channels on the plasma membrane, and that this effect is important for insulin activation of MAP kinase.

INDEX TERMS

Fura-2, calcium channel inhibitors, phenylephrine, mitogen-activated protein kinase

INTRODUCTION

In the last two decades, a number of studies have questioned the interaction of insulin with intracellular calcium. It was shown that insulin could inhibit α -adrenergic Ca^{2+} mobilization (14) and phosphorylase activation (51) in the liver. More recently, a study of the effects of insulin on α -adrenergic-induced Ca^{2+} oscillations in cultured liver cells showed mixed effects, insulin being stimulatory, inhibitory or without effect (44). However, at a concentration of 10 nM considered optimal for physiological responses *in vitro* (26,36), insulin generally decreased phenylephrine-induced intracellular Ca^{2+} oscillatory rate (8).

Other studies have found that the insulin-dependent stimulation of cAMP phosphodiesterases, of succinate oxidation and of protein synthesis was inhibited by the absence of external Ca^{2+} in liver cells (25,40). Similarly, insulin stimulation of protein synthesis and inhibition of lipolysis in rat adipocytes was found to be diminished by external Ca^{2+} removal (2). Very recently, dexfenfluramine, an oral hypoglycemic which exerts several insulin-like effects in rat hepatocytes, was found to increase intracellular Ca^{2+} in these cells (13).

On the other hand, the direct influence of insulin on intracellular Ca^{2+} in several cell types is still unclear. Conflicting results have been obtained in rat adipocytes (4,7,15) whereas no effect of insulin could be observed in a skeletal muscle cell line (29). However, insulin was found to increase intracellular Ca^{2+} in rat vascular smooth muscle cells (49) and in human erythrocytes (39). In the liver, a study using arsenazo III and Ca^{2+} titration in digitonin-permeabilized rat hepatocytes showed that insulin could increase steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 200 to 630 nM (46).

Signaling through the insulin receptor is a complex and multifaceted process that involves the activation of protein kinases and phosphatases, principally in three major transduction systems: the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway, the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and the p70^{rsk} pathway (31). For instance, insulin stimulates the activity of MAP kinase in whole liver (48) and in hepatocytes (1). In certain cell types, Ca²⁺ was demonstrated to play an important role in the activation of MAPK (12,43). The possibility thus exists that Ca²⁺ could be implicated in insulin-dependent phosphorylation cascades in the liver.

The primary aim of the present study was thus to examine the direct effect of insulin on [Ca²⁺]_i in isolated rat hepatocytes. We report that insulin increases hepatocellular [Ca²⁺]_i in a monophasic, reversible and dose-dependent manner. This increase was dependent on the presence of external Ca²⁺ ions and had a pharmacological sensitivity reminiscent of non-selective cation channels present on the hepatocyte plasma membrane. Moreover, conditions interfering with the effect of insulin on hepatocellular Ca²⁺ were also found to inhibit the stimulation of MAPK activity by the peptide hormone. The results thus show that insulin triggers Ca²⁺ influx into liver cells which appears to be implicated in the stimulation of MAPK activity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Sprague Dawley rats weighing 150-175 grams were ordered from Charles River Laboratories (St-Constant, Quebec, Canada) and allowed free access to Purina rat chow and tap water during their stay in the University's animal quarters.

Isolation and incubation of hepatocytes.

Rats were anesthetized with intraperitoneal injections of pentobarbital (50 mg/kg; C.D.M.V., St-Hyacinthe, Quebec) prior to surgery. Hepatocytes were isolated by collagenase digestion of the liver as previously described (24). Cells were purified by centrifugation on a Percoll gradient. Viability was determined by Trypan Blue exclusion and exceeded 85%. Freshly isolated hepatocytes were suspended at 3.5×10^5 cells/ml in Williams E medium containing 25 mM bicarbonate and 1% bovine serum albumin pH 7.4, 37°C. They were then allowed to adhere to collagen-coated round coverslips placed in 35 mm plastic Petri dishes. Cells were incubated for 60 min at 37°C in a humidified 5%CO₂/95%O₂ atmosphere before being used for the experiments.

Intracellular Calcium Measurements

After 60 min of culture, cells were loaded for 30 min at 20°C with the fluorescent probe FURA2-AM (2.5 μM) in bicarbonate-free Williams E medium supplemented with 2.5% fetal

bovine serum and 1% bovine serum albumin (21). Coverslips with adhered cells were transferred into a 100 μ l plastic chamber placed on the stage of an inverted microscope (Olympus IMT-2, Carsen Medical, Markham, Ontario) coupled to a spectrofluorimeter (Deltascan RF-D4010 Photon Technology International Inc., London, Ontario). Cells were perfused at a flow rate of 2-3 mL/min with a Krebs-Henseleit buffer containing (in mM) NaCl 120, NaHCO₃ 25, D-glucose 5.5, KCl 3.8, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, and Na-pyruvate 1, which was equilibrated with 95%O₂:5%CO₂ at 37°C. All hormones and pharmacological agents were dissolved into this buffer to the indicated final concentrations and solutions changes were made with an 8-way solenoid valve (General Valve, Fairfield, N.J.) having zero dead-space. The temperature in the chamber was maintained at 37°C with a custom-made heating tube designed by the Groupe de recherche en transport membranaire.

Fluorescence signals were obtained from hepatocyte couplets that represent an *in vitro* model where epithelial polarity (22) and tight electrical and ionic coupling (23) are maintained, thus ensuring synchronous Ca²⁺ responses in a more physiological setting than single isolated cells. Excitation wavelengths were 350 and 380 nm while fluorescence emission was measured at 505 nm. Intracellular dye calibration was performed *in situ* by perfusion of 10 μ M ionomycin in a solution containing either 4 mM EGTA (R_{min}, 350/380 fluorescence ratio in Ca²⁺ free solution) or 4 mM CaCl₂ (R_{max}, 350/380 fluorescence ratio at saturating Ca²⁺). The autofluorescence was determined by quenching free FURA acid with 2 mM MnCl₂ in the continued presence of ionomycin. Once corrected for autofluorescence, the fluorescence ratios (350/380) were transformed into [Ca²⁺], using the OSCAR software supplied by Photon Technology International.

Receptor binding assay

Freshly isolated hepatocytes were cultured in conditions similar to that used in fluorescence experiments except that they were seeded onto 14 cm plastic culture dishes previously coated with collagen. After maintenance of the cells in a humidified 5%CO₂/95%O₂ atmosphere for 60 min at 37°C, unattached cells were removed, medium was replaced with Krebs-Henseleit buffer and incubation prolonged for an additional 30 min to mimic fluorescence experiments. Cells were then washed twice with 10 ml of an ice-cold buffer containing 10mM Na₂HPO₄ and 130mM NaCl (pH 7.5) before being detached with a rubber policeman. The cells were centrifuged for 10 min at 600xg. The supernatant was aspirated and the cell pellet was resuspended in buffer B (10 mM NaHCO₃, 0.1mM EDTA, 0.1μM aprotinin, 1μM leupeptin, 1μM pepstatin A, 10 μM Pefabloc7SC) and then homogenized three times for 15 sec at 20500 rpm with a Polytron homogenizer. The homogenate was diluted with 15ml of buffer B, homogenized with a Potter homogenizer and centrifuged for 10 min at 1000xg. The pellet was discarded and the supernatant was centrifuged at 35000xg for 30 min. The pellet obtained was washed twice in 15ml of buffer C (50mM Tris-HCl, 250mM sucrose, 1mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1μM aprotinin, 1μM leupeptin, 1μM pepstatin, 10μM Pefabloc7SC, pH 7.4, 4°C). Cell membranes were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use. Protein concentration was measured using the Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) prior to the binding experiments. First, membranes (200μg protein per assay) were incubated for 10 min at 23°C in 50 μl buffer D (50mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 2mM MgCl₂, 0.5% BSA, pH 7.4) containing 7.2mM CaCl₂ or 16mM EGTA. Then, ¹²⁵I-labelled insulin (3x10⁵ cpm) and increasing concentrations of unlabelled insulin (final concentrations ranging from 1.5x10⁻¹²M to 1.5x10⁻⁶M) were added to give a final volume of 200μl. The binding assay was carried out at 23°C for 60 min. Bound ¹²⁵I-insulin was

The filters were counted for radioactivity in a LKB 1272 CliniGamma counter, with 70% efficiency. Average of triplicate determinations of bound ^{125}I -insulin was used for data analysis.

Determination of p44^{mapk} activity

Isolated hepatocytes were cultured as described above for binding studies except that 35 mm plastic petri dishes were used. Cells were challenged for 5 min at 37°C with a Krebs-Henseleit buffer containing 20 nM insulin or its vehicle. To assess the effects of 4 mM EGTA, of 200 μM verapamil, of 500 μM nickel or of 50 μM gadolinium, these agents were administered 15 min prior to and throughout the 5-min insulin challenge. The incubation was stopped by two rapid washes with ice-cold phosphate-buffered saline. The 35 mm Petri dishes were then quickly frozen on liquid nitrogen and stored at -80°C pending the enzyme assay. The enzymatic activity of p44^{mapk} was measured by an immune-complex kinase assay as previously described (30). Briefly, cell lysates were prepared as described (30) and 250 μg of lysate proteins were incubated for 4 hr at 4°C with 2 μl of p44^{mapk} antiserum SM1 (35) preadsorbed to protein A-sepharose beads. The immune complexes were washed twice with lysis buffer and once with MAP kinase assay buffer (1 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl_2 , 10 mM p-nitrophenylphosphate, 20 mM HEPES, pH 7.4). The phosphoesterase activity was assayed by resuspending the beads in MAPK assay buffer containing 0.25 mg/ml myelin basic protein (MBP), 50 μM ATP and 5 μCi [γ - ^{32}P]ATP. The reaction was carried out at 30°C for 10 min and stopped by addition of Laemli sample buffer. The samples were analyzed by SDS gel electrophoresis and the band corresponding to MBP was excised and counted. Protein kinase activities are expressed as pmoles of phosphate incorporated into MBP/min/mg of lysate protein.

Materials and Chemicals

Fura-2 acetoxymethylester (FURA2-AM) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Gadolinium chloride hexahydrate was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). ¹²⁵I-labelled porcine insulin, prepared to a specific activity of 2.2 mCi/mmol., was obtained from Du Pont Canada Inc. (Markham, Ontario). Unlabelled bovine insulin, bovine serum albumin (BSA, fraction V), leupeptin, aprotinin, pepstatin A and Pefabloc7SC, as well as all other chemicals, were purchased from Sigma (St-Louis, MO).

RESULTS

Effects of insulin on steady-state hepatocellular calcium

When perfused with Krebs-Henseleit buffer, isolated rat hepatocyte couplets exhibited a steady-state intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of 218 ± 5 nM ($n=58$), as observed previously by ourselves (6,21) and others (9,44,46). Figure 1 presents the experimental protocol used to evaluate the response of hepatocellular Ca^{2+} to insulin and to the classical α_1 -adrenergic agonist, phenylephrine. As shown by the representative trace illustrated in Figure 1A, two administrations of 5 μ M phenylephrine of 2 min duration triggered typical biphasic rises in liver cell $[Ca^{2+}]_i$ with an initial rapid peak followed by a plateau above baseline which receded upon removal of the agonist. When separated by a 5-min washout period, both phenylephrine responses were identical when measured by the area under the Ca^{2+} -versus-time curve (AUC, $n=5$), suggesting that little desensitization occurs in our experimental conditions.

When administered for 2 min, 1 nM insulin also caused $[Ca^{2+}]_i$ to rise. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ averaged 79 ± 2 nM ($n=10$) and was generally monophasic. The insulin-induced $[Ca^{2+}]_i$ response reached a peak within 63 ± 3 sec ($n=20$) and often returned toward baseline values before the 2-min insulin administration was stopped. Longer administration times also confirmed that the insulin effect on hepatocellular $[Ca^{2+}]_i$ was generally transient (data not illustrated). A small proportion of responses to insulin also displayed multiphasic rises in $[Ca^{2+}]_i$ reminiscent of oscillatory-like profiles (Figure 1B). Moreover, the response to two consecutive 2-min administrations of insulin, separated by a 5-min washout period, was found to be nearly identical (see Control in Table 1). Insulin-induced responses were comparable

whether the peptide was administered 5 min before (Figure 1C) or after (Figure 1D) a 2-min administration of 5 μ M phenylephrine. Figure 2 shows that $[Ca^{2+}]_i$ was increased by insulin in a dose-dependent fashion with an ED_{50} value of 0.50 ± 0.18 nM which falls within the physiological range (27). Thus the Ca^{2+} response to insulin was generally modest, but maximal peak changes observed with 50 nM concentrations of the hormone (128 ± 15 nM, $n=10$, see Figure 2) approached those induced by an optimal concentration of the α_1 -adrenergic agonist, phenylephrine (179 ± 8 nM, $n=38$).

In order to assess the role of extracellular Ca^{2+} in the insulin-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$, we carried out experiments in Krebs-Henseleit buffer lacking $CaCl_2$ and to which 4 mM EGTA was added. As illustrated in Figure 3, in such Ca^{2+} -free conditions, the response to insulin was not observed whereas that to phenylephrine was reduced to a single sharp peak as expected from the mobilization of Ca^{2+} from internal stores. Identical results were obtained with 1 or 10 nM insulin and whether the hormone was administered prior to (Figure 3A) or after (Figure 3B) phenylephrine. These results suggest that insulin promotes an influx of external Ca^{2+} into rat hepatocytes.

In order to rule out an effect of Ca^{2+} chelation on the binding of insulin to its receptor, we carried out displacement studies with ^{125}I -labelled insulin. Membranes of primary rat hepatocytes cultured in conditions identical to those used for fluorescence experiments were prepared and binding studies carried out at 20°C in the presence of 1.8 mM $CaCl_2$ or of 4 mM EGTA. As shown in Figure 4, non-linear regression analysis of data obtained in the presence of Ca^{2+} in four different cell preparations (4 rats) yielded a single high affinity binding site with a K_D of 6.31 ± 0.38 nM and a B_{max} of 592 ± 47 fmol/mg protein. The chelation of external Ca^{2+} with EGTA did not significantly modify K_D or B_{max} values (7.17 ± 2.05 nM and 555 ± 92 fmol/mg protein, respectively). Thus, the absence of a Ca^{2+} rise in response to insulin in Ca^{2+} -

free buffer does not appear to be related to a decrease in receptor occupancy.

Effects of calcium channel inhibitors on insulin-induced rise in hepatocellular calcium.

Since our results suggested that insulin induced Ca^{2+} influx into isolated hepatocytes, we next carried out a series of experiments using pharmacological agents known to interfere with Ca^{2+} entry pathways. We used the protocol depicted in Figure 1B where 2-min administrations of 20 nM insulin were separated by a 5 min washout period. As mentioned above, experiments showed that sequential responses to insulin were very similar. Indeed, when measured as the area under the Ca^{2+} -versus-time curve (AUC), the second insulin response averaged $96 \pm 4\%$ of the first one (Table 1). We next introduced pharmacological agents between the consecutive insulin administrations to evaluate their inhibitory potential. Verapamil is an inhibitor of voltage-activated calcium channels (10) which we have previously found to inhibit EGF-induced Ca^{2+} responses in conditions similar to the present studies (6). At a dose of 20 μM , verapamil had little effect on the insulin-induced Ca^{2+} response (data not illustrated). Even when the dose was increased to 200 μM , verapamil still did not affect the rise in Ca^{2+} induced by insulin (Table 1).

In contrast, nickel, a divalent cation blocker of calcium channels (28,37), inhibited the insulin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. At a concentration of 500 μM , nickel reduced the AUC of the second insulin response to $39 \pm 4\%$ of the first one (Table 1). Finally, we used gadolinium, a lanthanide ion previously shown to inhibit non-selective cation channels in hepatoma cells (3) and to interfere with Ca^{2+} entry caused by internal Ca^{2+} store depletion in cultured hepatocytes (5,18). At a concentration of 50 μM , gadolinium either completely abolished the response to insulin (5 out of 19 cases) or strongly inhibited it (by $58 \pm 4\%$ in 14 out of 19 cases, not

illustrated). On average, gadolinium thus reduced the AUC of the second insulin response to $31 \pm 5\%$ of the first one (Table 1).

Effect of insulin-induced calcium movements on MAP kinase activity

Finally, we studied the influence of Ca^{2+} movements on MAP kinase activity, a major component of the insulin receptor signaling cascade in liver cells. In standard Krebs-Henseleit buffer, insulin induced an increase in hepatocyte p44^{mapk} kinase activity which reached a peak at 5 min and declined toward baseline thereafter (not illustrated). As illustrated in Figure 5, when external Ca^{2+} was chelated with EGTA, the activation of p44^{mapk} by insulin was greatly diminished. Similarly, the addition of 500 μM nickel or 50 μM gadolinium strongly inhibited insulin-induced p44^{mapk} activation in these cells (Figure 5). In contrast, 200 μM verapamil did not significantly affect the enzyme activity. Control experiments also showed that neither external Ca^{2+} chelation nor any of the pharmacological agents affected unstimulated p44^{mapk} activity (results not illustrated).

DISCUSSION

The results of the present study clearly demonstrate that insulin causes a dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ in isolated rat hepatocyte couplets. The insulin-induced Ca^{2+} response was generally monophasic and transient whereas that to phenylephrine was biphasic and sustained for the duration of administration. This indicates that insulin and phenylephrine modulate hepatocellular Ca^{2+} homeostasis by different mechanisms. Indeed, the insulin-induced increase in hepatocellular Ca^{2+} was abolished when cells were perfused with EGTA and in the absence of Ca^{2+} , whereas the response to phenylephrine was reduced to a sharp transient peak as expected from the mobilization of internal stores. The absence of an insulin response was not due to the depletion of internal stores. Indeed, the lack of an insulin-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ was observed either before or after hepatocellular Ca^{2+} stores had been mobilized by phenylephrine. The possibility remained, however, that chelation of external Ca^{2+} ions could interfere with the binding of insulin to its receptor. Indeed, a number of studies have reported that extracellular Ca^{2+} can modulate the binding properties of insulin to its receptor (2,52). While the presence of external Ca^{2+} can enhance the affinity of insulin for its surface receptor, pronounced effects are generally obtained at non-physiological concentrations of Ca^{2+} (52) whereas at physiological Ca^{2+} concentrations, the effects on insulin binding are modest (2,52). Accordingly, in our experimental conditions, we observed no difference in K_m or B_{max} in insulin displacement studies carried out in the presence of physiological Ca^{2+} or in its absence. Thus, the lack of insulin effect on hepatocyte $[Ca^{2+}]_i$ in Ca^{2+} -free conditions does not result from a decrease in receptor occupancy.

Several growth factors whose receptors (like that of insulin) are tyrosine kinases, are known to couple to the γ -isoform of phospholipase C and to induce Ca^{2+} mobilization as a consequence of the production of phosphoinositides (50). In the liver, this is the case notably

for epidermal growth factor (11,47) and hepatocyte growth factor (38). However, to date there is no evidence that a similar coupling occurs between PLC- γ and the insulin receptor in liver cells. Indeed, our results clearly show that the effect of insulin on hepatocellular Ca^{2+} movement is absolutely dependent on the presence of external Ca^{2+} , which is not the case for other growth factors. As previously shown by our laboratory for Na^+/H^+ exchange in rat hepatocytes (24), the present studies thus support the notion that, despite the reported similarities between growth factor and insulin signal transduction pathways, these agents exert distinct short-term effects on liver cell membrane transport function.

Pathways of Ca^{2+} entry into hepatocytes have been the subject of numerous studies in the past several years, but no evidence has ever been found for the presence of voltage-dependent Ca^{2+} channels on liver cells (34) as is the case for most cells of epithelial origin (19). Recently, non-selective cation channels of 18 and 30 pS were described in primary cultures of rat hepatocytes and in HTC cells (33). These were later shown to be activated by intracellular Ca^{2+} ions and to be inhibited by protein kinase C (20). Evidence was also presented to show that these channels were insensitive to verapamil but were blocked by nickel and the compound SKF96365 (32). These properties are similar to those of agonist- and store-depletion-induced Ca^{2+} influx into liver cells. Indeed, several studies have clearly shown that nickel (37), SKF96365 (17) and lanthanide ions such as gadolinium (18) could inhibit Ca^{2+} influx into hepatocytes induced by agonists of G_q -coupled receptors. Gadolinium ions were also shown to inhibit Ca^{2+} influx triggered by thapsigargin-induced store depletion in rat hepatocytes (16).

In the present studies, the pharmacological sensitivity of insulin-induced Ca^{2+} influx was probed with verapamil, nickel and gadolinium. Verapamil at concentrations of 20 or 200 μM was ineffective at inhibiting insulin-induced Ca^{2+} influx as seen by others for vasopressin- or

angiotensin II-induced Ca^{2+} responses in rat hepatocytes (28). However, other investigators have reported an inhibitory effect of high doses of verapamil on calcitonin- (53) and vasopressin-induced (45) Ca^{2+} movements in rat liver cells. We have also previously observed that EGF-induced Ca^{2+} responses were reduced by verapamil in rat hepatocytes with a consequent reduction in mitogenic effects (6). However, the principal action of verapamil is to block voltage-dependent calcium channels which hepatocytes do not possess (34). The basis for the other reported effects of verapamil is unclear, as are the reasons for discrepancies between different studies, but it is possible that nonspecific actions of the drug are responsible. Nevertheless, our results bring further evidence for differences between insulin and growth factor action on membrane Ca^{2+} permeability in liver cells.

On the other hand, both nickel and gadolinium were very effective at inhibiting insulin-induced Ca^{2+} influx into isolated rat hepatocyte couplets. Together with the EGTA and verapamil results, this pharmacological profile is compatible with the implication of non-selective cation channels in the insulin-induced Ca^{2+} influx and with a lack of effect of the hormone on internal Ca^{2+} stores. However, further experimentation will be necessary to ascertain this interpretation and to elucidate the exact signaling pathway linking the insulin receptor to plasma membrane cation channels.

At present, we do not know the physiological significance of an insulin effect on liver cell membrane cation channels, some of which (non-selective cation channels) are thought to be implicated in the sustained plateau phase of the hepatocellular Ca^{2+} response to G_q -coupled receptor agonists such as phenylephrine. One attractive possibility is that insulin's effect, although apparently stimulatory, may interfere with the subsequent activation of the non-selective cation channels by classical G_q -coupled pathways. We have obtained preliminary evidence in favour of such a hypothesis by administering insulin immediately prior to and

throughout the second administration of phenylephrine in a protocol similar to that depicted in Figure 1A. Co-administration of insulin decreased the second phenylephrine response to $76 \pm 7\%$ ($n=10$) of the first one as opposed to a control value of $99 \pm 4\%$ ($n=5$) ($p=0.045$ by unpaired t-test; Benzeroual, van de Werve and Haddad, unpublished observations).

Nevertheless, the physiological role of Ca^{2+} entry into hepatocytes triggered by insulin remains unknown. Other reports have shown that the presence of extracellular Ca^{2+} was important for insulin's effect on cyclic AMP metabolism (25) or on succinate oxidation and protein synthesis (40) in rat hepatocytes but the mechanisms involved have not been elucidated. In the present studies, we have assessed the implication of insulin-induced Ca^{2+} movements on the peptide hormone's capacity to activate MAP kinase. In fact, evidence has already been presented that the activation of MAP kinase may proceed by Ca^{2+} -dependent pathways in certain cell types (12,42,43) which now include rat hepatocytes (41). Indeed, Romanelli and van de Werve (41) have recently found that hepatocellular MAP kinase activity could be stimulated not only by Ca^{2+} -mobilizing agonists, such as noradrenaline (α -adrenergic component) and vasopressin, but also by ionomycin, a Ca^{2+} ionophore, or by thapsigargin, an inhibitor of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Moreover, the stimulation of MAP kinase activity by these hormones and pharmacological agents was greatly inhibited by external Ca^{2+} chelation with EGTA suggesting that an influx of Ca^{2+} ions may be important for this effect.

In the liver, insulin clearly activates MAP kinase (1,48) although the role of the kinase in the short-term metabolic effect of the hormone remains to be elucidated. In the present studies, we have found that experimental conditions that interfere with insulin-induced Ca^{2+} influx (EGTA, nickel, gadolinium) were very efficient at inhibiting insulin-induced p44^{mapk} activation. On the other hand, verapamil, which was inefficient at blocking the insulin Ca^{2+} response was

equally ineffective at preventing the increase in p44^{mapk} activity caused by the hormone. In view of the results of Romanelli and van de Werve (41), our study strongly suggests that insulin-induced Ca²⁺ influx is also important for the coupling of the insulin receptor to MAP kinase activity.

In conclusion, the present studies demonstrate that insulin triggers an influx of Ca²⁺ into liver cells in a monophasic, transient and dose-dependent manner. This Ca²⁺ influx probably proceeds through cation channels whose exact identity remains to be determined. This novel action of insulin in liver cells is important for the stimulation of MAP kinase activity and may thus be implicated in certain actions of insulin on hepatic metabolism either directly or through crosstalk with G-protein-coupled responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by grants from the Medical Research Council of Canada, from the Canadian Diabetes Association and from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (F.C.A.R.). K.B. was the recipient of a studentship from the Groupe de Recherche en Transport Membranaire made possible by infrastructure grants from the F.C.A.R. and the Université de Montréal. P.H. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. S.M. is a scholar of the Medical Research Council of Canada. We thank D. Vallerand, E. Giasson and N. McNicholl for valuable technical assistance and Dr. André De Léan for help with insulin binding and dose-response curve analysis.

REFERENCES

1. AGIUS, L., M. PEAK, G. BERESFORD, M. AL-HABORI, AND T. H. THOMAS. The role of ion content and cell volume in insulin action. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 516-522, 1994.
2. AKHTAR, R. A. AND M. C. PERRY. Insulin action in isolated fat cells II. Effects of divalent cations on stimulation by insulin of protein synthesis, on inhibition of lipolysis by insulin, and on the binding of ¹²⁵I-labelled insulin to isolated fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* 585: 117-127, 1979.
3. BEAR, C. AND C. LI. Calcium-permeable channels in rat hepatoma cells are activated by extracellular nucleotides. *Am. J. Physiol.* 261: C1018-C1024, 1991.
4. BEGUM, N., W. LEITNER, J. E-B. REUSCH, K. E. SUSSMAN, AND B. DRAZNIN. GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity: Mechanism of Ca²⁺-induced inhibition of insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* 268: 3352-3356, 1993.
5. BERVEN, L. A., B. P. HUGHES, AND G. J. BARRITT. A slowly ADP-ribosylated pertussis-sensitive GTP-binding regulatory protein is required for vasopressin-stimulated Ca²⁺ inflow in hepatocytes. *Biochem. J.* 299: 399-407, 1994.
6. BILODEAU, M., S. J. PROVENCHER, S. NÉRON, P. HADDAD, S. VALLIERES, AND M. GASCON-BARRÉ. Hypocalcemia decreases the early and late responses to epidermal growth factor in rat hepatocytes. *Hepatology* 21: 1576-1584, 1995.

7. BLACKMORE, P. F. AND G. AUGERT. Effects of hormones on cytosolic free calcium in adipocytes. *Cell Calcium* 10: 561-567, 1989.
8. BUCHER, N. L. R., J. A. MCGOWAN, AND U. PATEL. Cell reproduction. In: *ICN/UCLA Symposium on Molecular Cell Biology*, edited by E. R. Dirksen, D. M. Prescott, and C. D. Fox. New York: Academic Press, 1978, p. 661.
9. BURGESS, G. M., G. S. J. BIRD, J. F. OBIE, AND J. W. PUTNEY, JR.. The mechanism for synergism between phospholipase C- and adenylylcyclase-linked hormones in liver. Cyclic AMP-dependent kinase augments inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} mobilization without increasing the cellular levels of inositol polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 266: 4772-4781, 1991.
10. CATTERALL, W. A. AND J. STRIESSNIG. Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 256-262, 1992.
11. CERPOVICZ, P. F. AND R. S. OCHS. Effects of EGF on the mass of inositol 1,4,5-trisphosphate and SN(1,2)-diacylglycerol in freshly isolated rat hepatocytes: Comparison with vasopressin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1055-1062, 1992.
12. CHAO, T. -S. O., K. L. BYRON, K. -M. LEE, M. VILLEREAL, AND M. R. ROSNER. Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. *J. Biol. Chem.* 267: 19876-19883, 1992.
13. COMTE, B., A. ROMANELLI, S. TCHU, AND G. VAN DE WERVE. Modulation of

glucagon-induced glucose production by dexfenfluramine in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 310: 61-66, 1995.

14. DEHAYE, J. -P., B. P. HUGHES, P. F. BLACKMORE, AND J. H. EXTON. Insulin inhibition of α -adrenergic actions in liver. *Biochem. J.* 194: 949-956, 1981.

15. DRAZNIN, B., M. KAO, AND K. E. SUSSMAN. Insulin and glyburide increase cytosolic free- Ca^{2+} concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes* 36: 174-178, 1987.

16. FERNANDO, K. C. AND G. J. BARRITT. Evidence from studies hepatocyte suspensions that store-operated Ca^{2+} inflow requires a pertussis toxin-sensitive trimeric G-protein. *Biochem. J.* 303: 351-356, 1994.

17. FERNANDO, K. C. AND G. J. BARRITT. Characterisation of the inhibition of the hepatocyte receptor-activated Ca^{2+} inflow system by gadolinium and SK&F 96365. *Biochim. Biophys. Acta* 1222: 383-389, 1994.

18. FERNANDO, K. C. AND G. J. BARRITT. Characterisation of the divalent cation channels of the hepatocyte plasma membrane receptor-activated Ca^{2+} inflow system using lanthanide ions. *Biochim. Biophys. Acta* 1268: 97-106, 1995.

19. FEWTRELL, C. Ca^{2+} oscillations in non-excitable cells. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 427-454, 1993.

20. FITZ, J. G., A. H. SOSTMAN, AND J. P. MIDDLETON. Regulation of cation channels

in liver cells by intracellular calcium and protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 266: G677-G684, 1994.

21. GASCON-BARRÉ, M., P. HADDAD, S. J. PROVENCHER, S. BILODEAU, F. PECKER, S. LOTERSZTAJN, AND S. VALLIERES. Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 2159-2167, 1994.

22. GRAF, J., A. GAUTAM, AND J. L. BOYER. Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6516-6520, 1984.

23. GRAF, J., R. M. HENDERSON, B. KRUMPHOLZ, AND J. L. BOYER. Cell membrane and transepithelial voltages and resistances in isolated rat hepatocyte couplets. *J. Membr. Biol.* 95: 241-254, 1987.

24. HAIMOVICI, J., J. S. BECK, D. VALLERAND, C. MOLLA-HOSSEINI, AND P. HADDAD. Different modulation of hepatocellular Na^+/H^+ exchange activity by insulin and EGF. *Am. J. Physiol.* 267: G364-G370, 1994.

25. IRVINE, F., A. V. WALLACE, S. R. SARAWAK, AND M. D. HOUSLAY. Extracellular calcium modulates insulin's action on enzymes controlling cyclic AMP metabolism in intact hepatocytes. *Biochem. J.* 293: 249-253, 1993.

26. IYNEDJIAN, P. B., D. JOTTERAND, T. NOUSPIKEL, M. ASFARI, AND P. R.

PILOT. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J. Biol. Chem.* 264: 21824-21829, 1989.

27. KARAM, J. H. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. In: *Basic and Clinical Pharmacology*, edited by B. G. Katzung. Toronto: Prentice Hall Canada, 1995, p. 637-654.

28. KASS, G. E. N., J. LLOPIS, S. C. CHOW, S. K. DUDDY, AND S. ORRENIUS. Receptor-operated calcium influx in rat hepatocytes: Identification and characterization using manganese. *J. Biol. Chem.* 265: 17486-17492, 1990.

29. KLIP, A., G. LI, AND W. J. LOGAN. Role of calcium ions in insulin action on hexose transport in L6 muscle cells. *Am. J. Physiol.* 247: E297-E304, 1984.

30. LEDUC, I., P. HADDAD, E. GIASSON, AND S. MELOCHE. Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 48: 582-592, 1995.

31. LEE, J. AND P. F. PILCH. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am. J. Physiol.* 266: C319-C334, 1994.

32. LIDOFKY, S. D. Properties of hepatocellular cation-selective channels suggest a prominent role in receptor-mediated calcium entry. *Hepatology* 22: 306A, 1995.(Abstract)

33. LIDOFKY, S. D., M. H. XIE, A. SOSTMAN, B. F. SCHARSCHMIDT, AND J. G. FITZ. Vasopressin increases cytosolic sodium concentration in hepatocytes and activates

calcium influx through cation-selective channels. *J. Biol. Chem.* 268: 14632-14636, 1993.

34. MAUGER, J. P. AND M. CLARET. Calcium channels in hepatocytes. *J. Hepatology* 7: 278-282, 1988.

35. MELOCHE, S. Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J. Cell. Physiol.* 163: 577-588, 1995.

36. MORIN, O., M. FEHLMANN, AND P. FREYCHET. Binding and action of insulin and glucagon in monolayer cultures and fresh suspensions of rat hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 25: 339-352, 1982.

37. NATHANSON, M. H., A. GAUTAM, R. BRUCK, C. M. ISALES, AND J. L. BOYER. Effects of Ca²⁺ agonists on cytosolic Ca²⁺ in isolated hepatocytes and on bile secretion in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 15: 107-116, 1992.

38. OSADA, S., S. SAJI, T. NAKAMURA, AND Y. NOZAWA. Cytosolic calcium oscillations induced by hepatocyte growth factor (HGF) in single fura-2-loaded cultured hepatocytes: Effects of extracellular calcium and protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1135: 229-232, 1992.

39. PAOLISSO, G., A. GAMBARDELLA, V. BALBI, D. GALZERANO, M. VERZA, M. VARRICCHIO, AND F. D'ONOFRIO. Effects of magnesium and nifedipine infusion on insulin action, substrate oxidation, and blood pressure in aged hypertensive patients. *Am. J.*

Hypertens. 6: 920-926, 1993.

40. ROGERS, K. S., R. A. MENON, C. MOHAN, P. J. GEIGER, AND S. P. BESSMAN. Extracellular phosphate requirement for insulin action on isolated rat hepatocytes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 45: 344-349, 1991.

41. ROMANELLI, A. AND G. VAN DE WERVE. Activation of mitogen-activated protein kinase in freshly isolated rat hepatocytes both by a calcium- and protein kinase C-dependent pathway. *Metabolism* 1997.(In Press)

42. ROSEN, L. B. AND M. E. GREENBERG. Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1113-1118, 1996.

43. SADOSHIMA, J., Z. QIU, J. P. MORGAN, AND S. IZUMO. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes: The critical role of Ca^{2+} -dependent signaling. *Circ. Res.* 76: 1-15, 1995.

44. SOMOGYI, R., M. ZHAO, AND J. W. STUCKI. Modulation of cytosolic- $[Ca^{2+}]$ oscillations in hepatocytes results from cross-talk among second messengers. The synergism between the α_1 -adrenergic response, glucagon and cyclic AMP, and their antagonism by insulin and diacylglycerol manifest themselves in the control of the cytosolic- $[Ca^{2+}]$ oscillations. *Biochem. J.* 286: 869-877, 1992.

45. STRIGGOW, F. AND R. BOHNENSACK. Verapamil and diltiazem inhibit receptor-operated calcium channels and intracellular calcium oscillations in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 318: 341-344, 1993.
46. STRUNECKA, A. Cytosolic free Ca^{2+} level in isolated hepatocytes: The effect of insulin. *Gen. Physiol. Biophys.* 4: 505-516, 1985.
47. TANAKA, Y., N. HAYASHI, A. KANEKO, T. ITO, E. MIYOSHI, Y. SASAKI, H. FUSAMOTO, AND T. KAMADA. Epidermal growth factor induces dose-dependent calcium oscillations in single Fura-2loaded hepatocytes. *Hepatology* 16: 479-486, 1992.
48. TOBE, K., T. KADOWAKI, K. HARA, Y. GOTOH, H. KOSAKO, S. MATSUDA, H. TAMEMOTO, K. UEKI, Y. AKANUMA, E. NISHIDA, AND Y. YAZAKI. Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J. Biol. Chem.* 267: 21089-21097, 1992.
49. TOUYZ, R. M. AND E. L. SCHIFFRIN. Insulin-induced Ca^{2+} transport is altered in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 23: 931-935, 1994.
50. ULLRICH, A. AND J. SCHLESSINGER. Signal transduction by receptor tyrosine kinase activity. *Cell* 60: 755-765, 1990.
51. VAN DE WERVE, G., L. HUE, AND H. -G. HERS. Hormonal and ionic control of the

glycogenolytic cascade in rat liver. *Biochem. J.* 162: 135-142, 1977.

52. WILLIAMS, P. F., I. D. CATERSON, G. J. COONEY, R. R. ZILKENS, AND J. R. TURTLE. High affinity insulin binding and insulin receptor-effector coupling: Modulation by Ca^{2+} . *Cell Calcium* 11: 547-556, 1990.

53. YAMAGUCHI, M. Stimulatory effect of calcitonin on Ca^{2+} inflow in isolated rat hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 75: 65-70, 1991.

TABLE 1

Effects of calcium channel inhibitors on insulin-induced Ca^{2+} response

TREATMENT	AUC 2 / AUC 1	N
CONTROL	96 ± 4%	11
VERAPAMIL 200 μM	98 ± 3%	10
NICKEL 500 μM	* 39 ± 4%	8
GADOLINIUM 50 μM	* 31 ± 5%	19

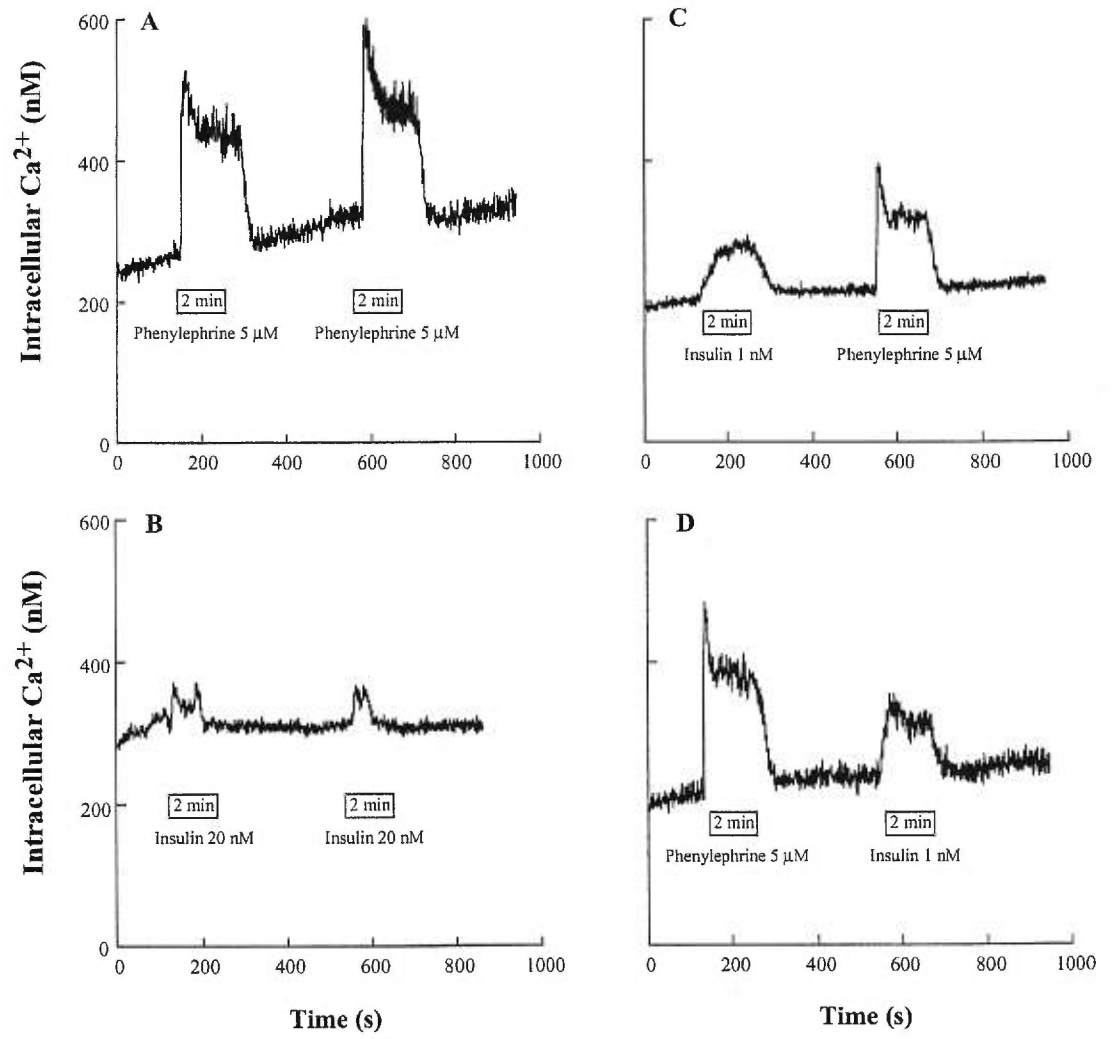
A protocol identical to that depicted in figure 1B was used to assess the effects of the specified calcium channel inhibitors on insulin-induced Ca^{2+} response. Inhibitors were administered upon the return of intracellular Ca^{2+} to basal values after the first insulin response and were present throughout the second one. Values are expressed as the mean \pm SEM of the specified number of experiments and represent the percentage of the second insulin response (measured as the area under the Ca^{2+} -versus-time curve, AUC 2) in relation to the first one (measured as the area under the Ca^{2+} -versus-time curve, AUC 1). Differences between treatment groups were determined by analysis of variance and pairwise comparisons obtained by Dunnett's method.

* significantly different from control, $p < 0.05$.

Legend to figure 1

Representative responses of intracellular calcium to phenylephrine and insulin in isolated rat hepatocyte couplets. A: 5 μ M phenylephrine was administered for 2 min and the administration repeated after a 5-min washout period (trace representative of 5 experiments). Note typical biphasic Ca^{2+} response and lack of desensitization. B: 20 nM insulin was administered for 2 min and the administration repeated after a 5-min washout period. The multiphasic pattern of the insulin-induced increase in intracellular Ca^{2+} was observed in a small proportion of experiments (trace representative of 3 out of 11 experiments). More common monophasic Ca^{2+} responses were similar when a 2 min administration of 1 nM insulin was given 5-min prior to (panel C) or after (panel D) a 2 min administration of 5 μ M phenylephrine (traces representative of 6 experiments for each protocol).

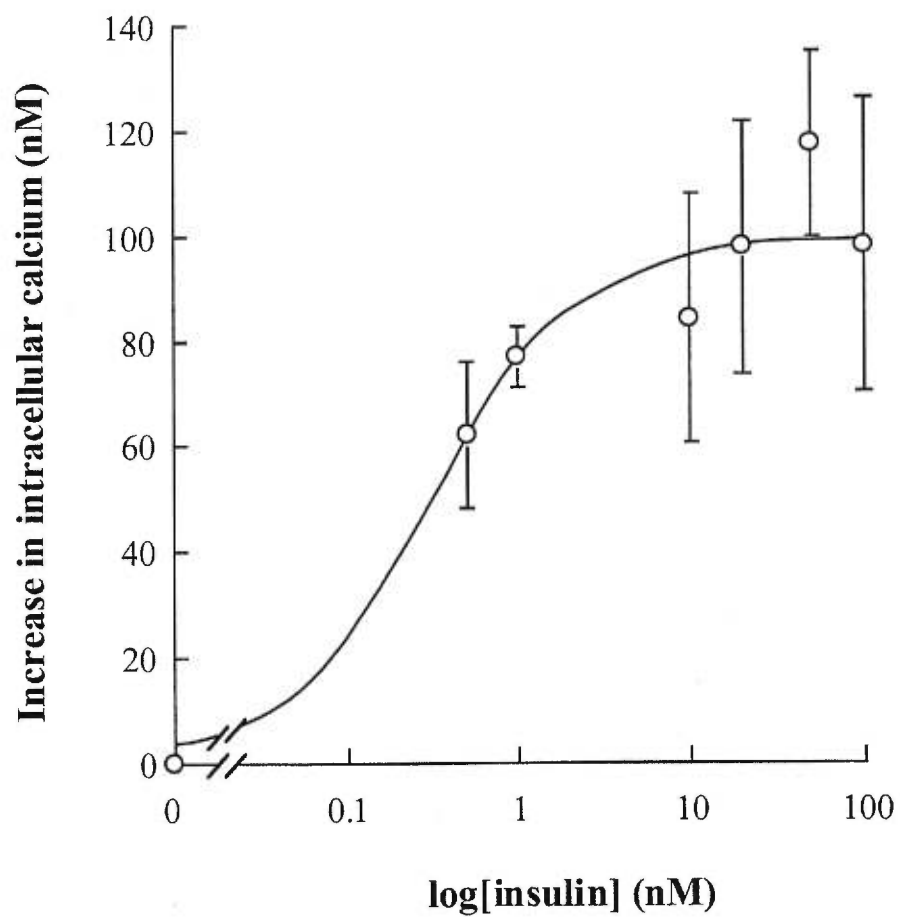
Figure 1



Legend to figure 2**Dose-response curve for insulin-induced rise in hepatocellular calcium.**

Peak changes in intracellular Ca^{2+} induced by the indicated doses of insulin were normalized by the ratio of peak phenylephrine-induced responses in paired experiments (as depicted in Figure 1, panels C and D) related to the average peak response induced by phenylephrine in the overall studies. Values represent the mean \pm SEM of 5 to 10 experiments for each insulin concentration. The curve represents the non-linear fit of the dose-response relationship and yields an ED50 value of 0.50 ± 0.18 nM.

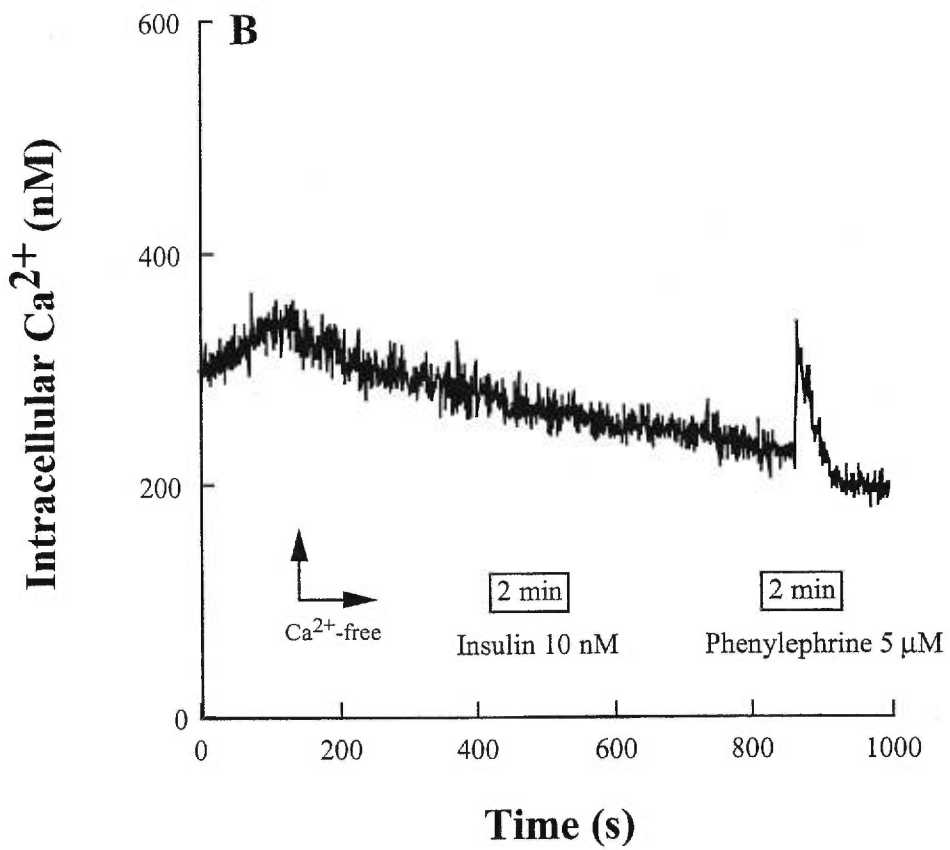
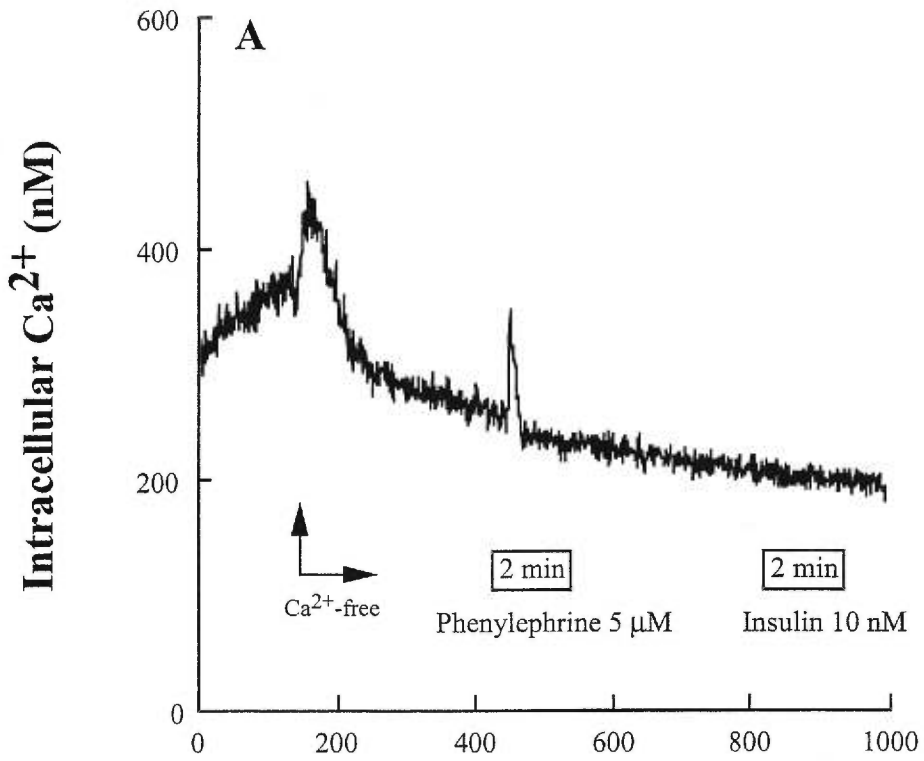
Figure 2



Legend to figure 3

Effect of external calcium chelation on insulin- and phenylephrine-induced changes in intracellular calcium in isolated rat hepatocyte couplets. Experiments similar to those depicted in figure 1 (panels C and D) were repeated after switching to a Krebs-Henseleit buffer devoid of CaCl_2 and containing 4 mM EGTA (Ca^{2+} -free). A 2-min administration of 10 nM insulin failed to induce changes in intracellular Ca^{2+} whether given 5 min before (panel B) or after (panel A) a 2-min administration of 5 μM phenylephrine (traces representative of 6 and 8 experiments respectively). Note that phenylephrine response is reduced to a sharp transient increase as expected from the mobilization of internal Ca^{2+} stores.

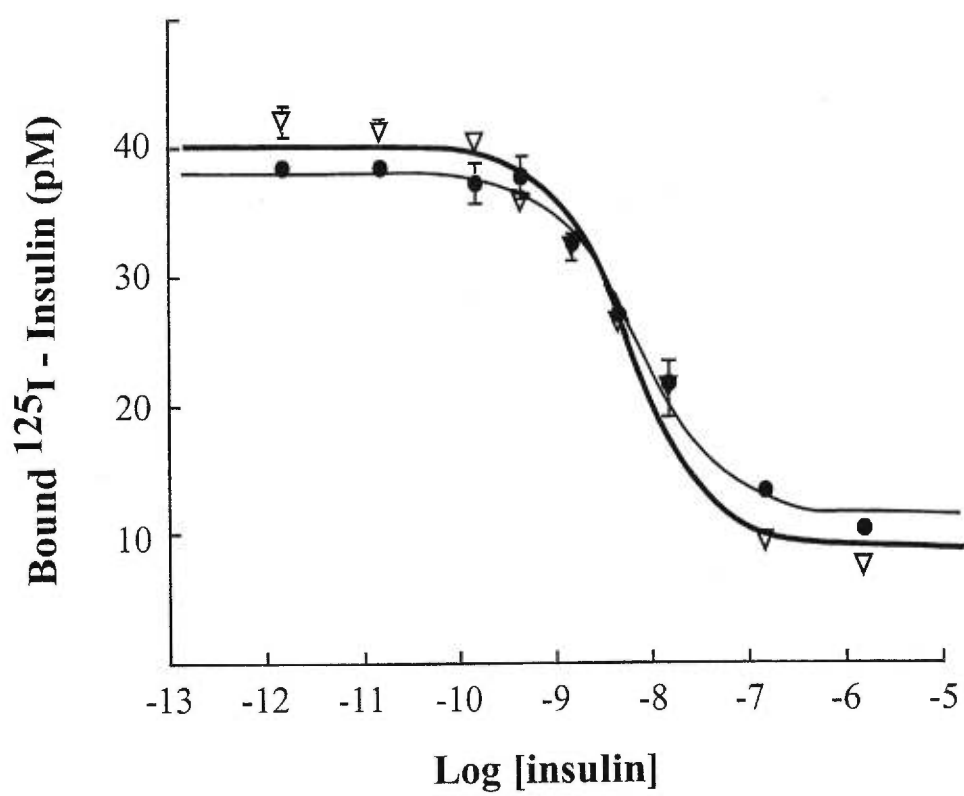
Figure 3



Legend to figure 4

Effect of external calcium chelation on the displacement of ^{125}I -labelled insulin by unlabelled ligand. Membranes of cultured rat hepatocytes were prepared as described in MATERIALS AND METHODS, and displacement studies carried out in the presence of 1.8 mM CaCl_2 (\bullet) or of 4 mM EGTA (∇). Values represent the mean \pm SEM of 4 series of experiments (4 different membrane preparations). The curves represent the non-linear fit of the data points which yield similar K_D and B_{max} values as described in the text.

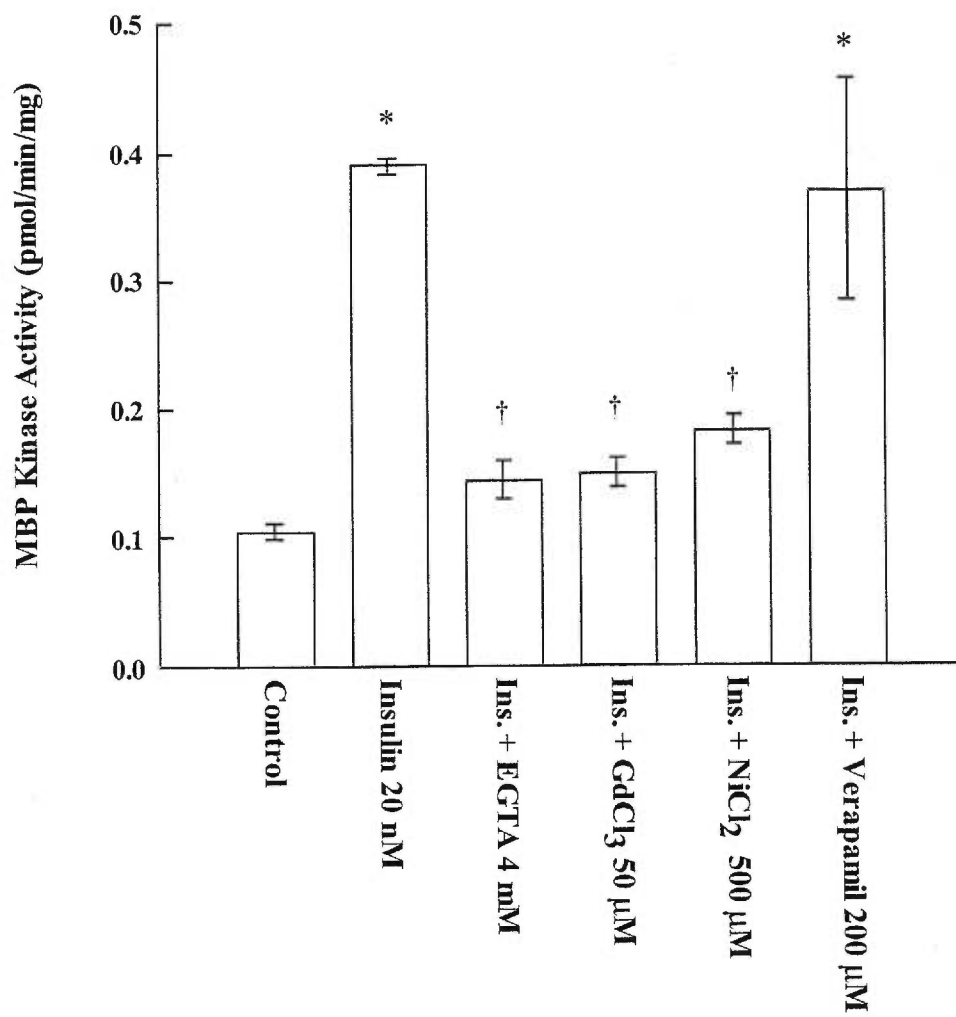
Figure 4



Legend to figure 5

Effects of external calcium chelation and of calcium channel inhibitors on insulin-induced activation of p44^{mapk}. p44^{mapk} activity was assessed in cultured rat hepatocytes by an immune-complex assay as described in MATERIALS AND METHODS. A 5-min stimulation with 20 nM insulin was carried out with or without a 15-min pre-treatment with EGTA or the specified calcium channel inhibitor. Results are expressed as the mean \pm SEM of triplicate determinations of p44^{mapk} phosphoesterase activity towards myelin basic protein (MBP kinase activity) and are representative of 3 experiments. Differences between treatment groups were determined by analysis of variance. Pairwise comparisons were obtained by Bonferroni t-test: * significantly different from basal activity (control), $p < 0.05$; H significantly different from insulin alone, $p < 0.05$.

Figure 5



5.2 Article 2

Insulin-induced Ca^{2+} entry into hepatocytes is important for PI-3Kinase activation but not for IR β -subunit and IRS-1 tyrosine phosphorylation

Par

Kenza Benzeroual, Sanjay K Pandey, Ashok K Srivastava, Gérald van de Werve et Pierre haddad

Sous presse

Dans

Biochim.Biophys.Acta

Comme on l'a montré dans l'article précédant, l'insuline provoque un influx de calcium dans les hépatocytes isolés de rat. Cet influx est important pour l'activité MAK. Étant donné l'importance de la voie PI3-K dans la cascade de signalisation de l'insuline, nous avons évalué le rôle du calcium au niveau de cette seconde voie majeure intervenant dans divers effets physiologiques de l'insuline. L'étude décrite dans cette article montre que l'insuline stimule l'activité PI3-K de manière dépendante du temps d'incubation et de la dose dans les hépatocytes de rat isolés et mis en culture à court terme. Nos résultats montrent aussi que la préincubation des hépatocytes en présence d'EGTA, du nickel et du gadolinium bloquent fortement la stimulation de l'activité de cette enzyme en réponse à l'insuline. Ce profil pharmacologique est similaire à celui obtenu précédemment pour la stimulation de l'activité MAPK. Ceci suggère que l'influx de calcium joue aussi un rôle important dans l'activité PI3-K. Étant donné que l'activité MAPK et PI3-K sont principalement stimulées par l'IRS-1 phosphorylé sur les tyrosines en réponse à l'insuline, nous avons évalué l'effet de l'influx calcique sur la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 et de la sous-unité β du récepteur à l'insuline. Nos résultats montrent que la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 par l'insuline n'est pas affectée par la chélation du calcium par l'EGTA ni par les bloqueurs de canaux calciques dont le nickel, le gadolinium et le vérapamil. Ceci indique que la phosphorylation d'IRS-1 n'est pas un prérequis pour l'activation du canal. Nos résultats suggèrent donc que l'influx de calcium induit par l'insuline est important pour coupler le récepteur de l'insuline à l'activité MAPK et PI3-K.

**INSULIN-INDUCED Ca^{2+} ENTRY IN HEPATOCYTES IS IMPORTANT FOR
PI 3-KINASE ACTIVATION BUT NOT FOR INSULIN RECEPTOR AND IRS-1
TYROSINE PHOSPHORYLATION**

Kenza BENZEROUAL^{1,2}, Sanjay K. PANDEY^{3,6}, Ashok K. SRIVASTAVA^{3,4,6}, Gérald van de WERVE^{1,5,7} and Pierre S. HADDAD^{1,2,3}

Groupe de recherche en transport membranaire¹, Départements de pharmacologie², de physiologie³, de médecine⁴ et de nutrition⁵, Université de Montréal et Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Campus Hôtel-Dieu⁶ et Notre-Dame⁷, Montréal, Québec, Canada

SHORT TITLE : Implication of calcium in PI3K activation by insulin

KEY WORDS: Insulin, hepatocyte, phosphatidylinositol-3-kinase, calcium, insulin receptor, insulin receptor substrate-1

ADDRESS FOR CORRESPONDANCE

Pierre S. Haddad, Ph.D.
Département de Pharmacologie
Université de Montreal
P.O.Box 6128, Downtown Station
Montréal (Québec)
CANADA H3C 3J7

Telephone : (514) 343-6590
Fax : (514) 343-2291
E-mail : pierre.haddad@umontreal.ca
URL : <http://www.pharmco.umontreal.ca/Haddad.htm>

SUMMARY

Insulin produces an influx of Ca^{2+} into isolated rat hepatocyte couplets that is important to couple its tyrosine kinase receptor to MAPK activity (Benzeroual et al., *Am.J.Physiol.*272,G1425-G1432,1997). In the present study, we have examined the implication of Ca^{2+} in the phosphorylation state of the insulin receptor (IR) β -subunit and of insulin receptor substrate-1 (IRS-1), as well as in the stimulation of PI 3-kinase activity in cultured hepatocytes. External Ca^{2+} chelation (EGTA 4mM) or administration of Ca^{2+} channel inhibitors gadolinium 50 μM or nickel 500 μM inhibited insulin-induced PI 3-kinase activation by 85%, 50% and 50 % respectively, whereas 200 μM verapamil was without effect. In contrast, the insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR β -subunit and of IRS-1 was not affected by any of the experimental conditions. Our data demonstrate that the stimulation of PI3-kinase activity by the activated insulin receptor, but not the phosphorylation of IR β -subunit and IRS-1, requires an influx of Ca^{2+} . Ca^{2+} thus appears to play an important role as a second messenger in insulin signaling in liver cells.

INTRODUCTION

At the cellular level, insulin promotes a wide variety of biological functions, including stimulation of amino acid and glucose transport, modulation of enzyme activities and of gene expression, and enhancement of DNA synthesis[1]. Through these events, insulin acts as a central regulator in glucose, lipid and protein metabolism in liver and other peripheral tissues in response to environmental changes.

Signaling through the insulin receptor is a complex process that involves the activation of protein kinases and phosphatases, principally in at least two major transduction systems: one involving mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) and another involving phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase). In most cells, insulin initiates its effects by interacting with the α -subunit of its receptor with subsequent activation of the tyrosine kinase activity of the β -subunit followed by receptor autophosphorylation [1; 2]. Activation of the insulin receptor (IR) tyrosine kinase also leads to tyrosyl phosphorylation of a number of intracellular proteins, the most prominent being the cytosolic insulin receptor substrate-1 (IRS-1) [3]. Considerable evidence demonstrates that IR tyrosine kinase activity and associated IRS-1 phosphorylation are essential for many of the complex cellular responses to insulin [1; 4; 5].

IRS-1 acts as an intermediate docking protein between the IR and cytoplasmic proteins containing SH2 domains [3]. For instance, when IRS-1 is tyrosine phosphorylated, it can bind and activate PI 3-kinase in several cells in vivo and in vitro, including the liver [3;

6-9]. This enzyme is composed of a 85-kD regulatory subunit [10] and a 110 kD catalytic subunit that phosphorylates phosphatidylinositol (PI) as well as its 4 and 4,5 phosphorylated derivatives in the D-3 position of the inositol ring [11]. PI 3-kinase plays a key role in mediating several biological effects of insulin such as glucose transport [12], glycogen synthesis [13], and transcriptional regulation of several genes [14; 15]. Thus, IR, IRS-1, and PI 3-kinase represent three of the earliest steps in one branch of the insulin signaling cascade.

In the liver, insulin is also known to promote cation influx and this was found to be important for the hormone's action [16]. Moreover, we have recently demonstrated that insulin induces an increase in cytosolic Ca^{2+} in primary rat hepatocytes. This increase was dependent on the presence of external Ca^{2+} but was independent of effects on insulin binding [17]. It also had a pharmacological sensitivity reminiscent of non-selective cation channels present on the hepatocyte plasma membrane [18; 19]. Finally, conditions interfering with the effect of insulin on hepatocellular Ca^{2+} were also found to inhibit the stimulation of MAPK activity by the hormone. We concluded that insulin triggers Ca^{2+} influx into liver cells and this effect is important for the stimulation of the MAPK signaling cascade [17].

The question of the implication of Ca^{2+} in other pathways of insulin action in the liver thus arose. Therefore, the aim of the present work was to examine the implication of Ca^{2+} in the other major branch of the insulin signal transduction pathway, namely PI 3-kinase activation. To gain further insight on the site of action of the divalent cation, we

also examined the effect of Ca^{2+} on the phosphorylation state of the IR β -subunit and of IRS-1.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Gadolinium chloride hexahydrate was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Polyclonal antibody against the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase was purchased from Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz, CA); it is directed against an epitope corresponding to amino acids 333 to 430 of the protein. Anti-phosphotyrosine, anti-human insulin receptor β -subunit and anti-rat carboxyterminal IRS-1 antibodies were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Goat anti-mouse antibodies conjugated to alkaline phosphatase were from Bio-Rad (Mississauga, ON). Silica gel-60 plates were purchased from Merck & Co. (Rahway, NJ). Protein A sepharose beads were obtained from Pharmacia Biotech (Mississauga, ON). Bovine insulin, bovine serum albumin (BSA fraction V), leupeptin, aprotinin, pepstatin A, as well as other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 150-175g were ordered from Charles River Breeding Laboratories (St.-Constant, QC) and allowed free access to Purina rat chow and tap water. Animals were treated in accordance with the guidelines of the Canadian

Council for the Care of Animals and all experimental protocols were accepted by the university ethics committee.

Isolation and incubation of hepatocytes

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50mg/kg; Centre de Distribution de Médicaments Vétérinaires, St-Hyacinthe, QC) prior to surgery. Hepatocytes were isolated by collagenase digestion of the liver as previously described [20]. Cells were purified by centrifugation on a Percoll gradient. Viability was determined by Trypan blue exclusion and exceeded 85%. Freshly isolated hepatocytes were suspended in William's E medium containing 25 mM bicarbonate and 1% BSA, pH 7.4, at 37°C. Cells were then seeded onto 35-mm plastic petri dishes previously coated with rat tail collagen. Thereafter, cells were incubated for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ - 95% O₂. Unattached cells were then removed, medium was replaced with Krebs-Henseleit buffer, and incubation was prolonged for an additional 30 min. These conditions are similar to fluorescence experiments where insulin was found to increase intracellular calcium [17].

PI 3-kinase assay

The assay was performed essentially as described by Fukui and Hanafusa [21] with minor modifications [22]. Isolated hepatocytes were cultured as described above. Cells were challenged at 37°C with Krebs-Henseleit buffer containing insulin or its vehicle. To assess the effects of 4 mM EGTA, 200 µM verapamil, 500 µM nickel or 50 µM gadolinium, these agents were administered 15 min before and throughout the insulin

challenge. The incubation was stopped by two rapid washes with ice-cold phosphate-buffered saline. The 35-mm petri dishes were then quickly frozen on liquid nitrogen and stored at -80°C pending the enzyme assay. The cells were lysed in buffer A (25 mM Tris-HCL, pH 7.5, 25 mM NaCl, 1 mM Na orthovanadate, 10 mM Na fluoride, 10 mM Na pyrophosphate, 20 nM okadaic acid, 0.5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1% Triton X-100 and 0.1% SDS). The cells were scraped and centrifuged at $12,000 \times g$ for 12 min. Equal amount of lysate proteins were incubated with $5\mu\text{l}$ of p85-antibody for two hours at 4°C . Protein A-sepharose beads were then added and the resulting mixture was incubated for an additional two hours at 4°C . The beads were centrifuged in a microtube for 15 sec and the pellet was washed 3-times with HNTG medium (20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 10% Glycerol, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 mM PMSF), once with 0.5 M LiCl/ 0.1 M Tris pH 7.5, once with H_2O and finally with 0.1 M NaCl/1 mM EDTA/20 mM Tris pH 7.5. Beads were then resuspended in 50 μl of kinase buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM EGTA). Then 1 μl of a 20 mg/ml concentration of pure L- α -phosphatidylinositol (PI) (bought from Sigma) dissolved in DMSO was added to the reaction mixture to make micelles of PI. The mixture was vortexed and preincubated at room temperature for 10 min. Subsequently, (γ - ^{32}P) ATP (2 mCi/ml) (10 μCi per assay) and MgCl_2 (10 mM) were added to start the reaction and the mixture was incubated for 2-3 min at room temperature. The reaction was stopped by addition of 150 μl of CHCl_3 : CH_3OH : HCL (100:200:2) and 100 μl of CHCl_3 was added to separate the phases. The inferior organic phase was taken and washed with one volume of CH_3OH :HCL (1:1). The lipid samples were concentrated in vacuo and spotted onto a silica gel 60 plate

which was later developed in $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (43:38:5:7). The phosphorylated lipids were visualized by autoradiography and the area corresponding to each spot was quantified by using a phosphorimager (Molecular Dynamics). A similar method has been used by other investigators to demonstrate insulin-stimulated PI3-kinase activity in CHO cells[23] and adipocytes[24].

Insulin receptor β -subunit tyrosine phosphorylation

The cells were stimulated as described for PI 3-kinase assay and were lysed on ice in 200 μl of buffer A. The lysates were clarified by centrifugation for 12 min at 10,000 \times g and then incubated overnight at 4°C with 5 μl of anti-human IR β -subunit antibody preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immunoprecipitate was collected with protein A Sepharose and washed 3 times with 50 mM Hepes buffer, pH 7.5, containing 0.1 % Triton X-100 and 0.1% SDS and 2 times with the same buffer without SDS. The immunoprecipitate was solubilized by boiling in 2X sample buffer for 10 min. The solubilized fraction was submitted to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels and blotted with antiphosphotyrosine antibody (1:1000). The blots were developed by using goat-anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (1:3000) [25].

IRS-1 tyrosine phosphorylation

Cells were stimulated and lysed as described above. Equal amounts of protein from cell lysates were added to the anti IRS-1 antibody-protein A-Sepharose complex and incubation continued overnight at 4°C. The immunoprecipitate was collected by centrifugation in a microtube for 15 sec and the pellet was washed 3-times with ice-cold

PBS. The beads were boiled in 3X Laemmli's sample buffer, submitted to electrophoresis on 10 % SDS-polyacrylamide gels, transferred to PVDF membranes, blotted with antiphosphotyrosine antibody (1:1000) and detected by goat-anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (1:3000)[22].

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical significance between treatment groups was evaluated by one-way analysis of variance. Differences between group means were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Time-dependence of PI 3-kinase activity

We first evaluated the time-course of PI 3-kinase activity in response to insulin in primary cultures of rat hepatocytes, as it had not been directly examined in this model previously. Figure 1 presents the results of experiments where hepatocytes were stimulated with 10 nM insulin for the indicated times. PI 3-kinase was then immunoprecipitated by using antibodies to the p85 subunit of the enzyme. Immune complexes were subjected to PI 3-kinase assay as detailed in the Methods section. As expected, insulin caused a time-dependent increase in PI 3-kinase activity. The effect of

insulin was evident as early as 1 min and maximal at 3 min. Thereafter, PI 3-kinase activity remained elevated for at least 15 min after exposure to the hormone. The duration of insulin's effect on PI 3-kinase in primary hepatocytes was similar to that reported in CHO cells [23] and in adipocytes [24].

Dose-dependence of PI 3-kinase activity

Similarly, the concentration dependence of the insulin action on PI 3-kinase activity in cultured rat hepatocytes had not been reported. Therefore, primary hepatocytes were stimulated with increasing concentrations of insulin (0.1 to 100 nM) for 3 min. As shown in figure 2, an increase in PI 3-kinase activity was detectable after exposure to 0.1 nM insulin (1.5 fold stimulation above basal values) and optimal stimulation was observed with 10 nM insulin (4-fold stimulation), as seen for several other insulin-dependent actions in such preparations [26; 27]. When the data were fitted for a standard dose-response relationship, a half-maximal effective dose of 1.1 ± 0.5 nM insulin was obtained which falls within the physiological range [28]. Thus, insulin-induced stimulation of PI 3-kinase in isolated cultured hepatocytes was dose-dependent as previously observed in whole liver [29] and in isolated adipocytes [24].

Effect of Ca^{2+} on insulin-induced PI 3-kinase activity.

Since interference with Ca^{2+} movements was previously shown to prevent insulin-stimulated MAPK activity [17], we were interested to explore if Ca^{2+} was also implicated in other insulin-stimulated pathways. As presented above, an optimal increase in hepatocyte PI 3-kinase activity was observed once the cells were stimulated

with 10 nM insulin for 3 min (figures 1 and 2). We thus used these conditions to examine the effects of external Ca^{2+} chelation and of Ca^{2+} channel inhibition. As shown in figure 3, chelation of extracellular Ca^{2+} with EGTA inhibited insulin-induced activation of PI 3-kinase by 85 %. We also tested the effect of nickel, a divalent cation blocker of Ca^{2+} channels [30; 31], and of gadolinium, a trivalent ion of the lanthanide series previously shown to inhibit non-selective cation channels in hepatoma cells [32] and to interfere with Ca^{2+} entry caused by internal Ca^{2+} store depletion in cultured hepatocytes [33; 34]. At respective doses of 500 μM and 50 μM , both Ni^{2+} and Gd^{3+} inhibited insulin-induced PI 3-kinase activation by 50 % (figure 3). In contrast, verapamil, an inhibitor of voltage-activated Ca^{2+} channels [35], did not significantly affect the stimulation of enzyme activity by insulin. Control experiment also demonstrated that neither external Ca^{2+} chelation nor any of the pharmacological agents affected basal PI 3-kinase activity (results not illustrated). The pharmacological profile of the PI 3-kinase response is similar to that obtained previously for insulin-induced stimulation of MAPK activity [17] and thus suggests that Ca^{2+} influx may also play an important role in this other major signaling pathway in liver cells [29].

Effect of Ca^{2+} on insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR β -subunit and of IRS-1

Moving upstream in the insulin signaling cascade, we next evaluated the implication of Ca^{2+} movements in the insulin-induced phosphorylation of both IRS-1 and IR β -subunit. Hepatocytes were again stimulated for 3 min with 10 nM insulin. As shown in figure 4, insulin induced a stimulation of IRS-1 tyrosine phosphorylation as expected. There was

no statistical significant difference in the tyrosine phosphorylation of IRS-1 in groups pretreated with EGTA, Ni^{2+} , Gd^{3+} or verapamil as compared to those stimulated with insulin alone.

Figure 5 presents the results obtained for IR β -subunit tyrosine phosphorylation. As expected, stimulation of hepatocytes with 10 nM insulin for 3 min yielded a significant increase in the amount of tyrosine-phosphorylated IR β -subunit. However as observed with IRS-1, chelation of external Ca^{2+} or pretreatment with Ni^{2+} , Gd^{3+} or verapamil did not significantly influence this action of insulin as ascertained by one-way ANOVA.

DISCUSSION

The implication of intracellular Ca^{2+} as a mediator in insulin action was originally proposed by Clausen and colleagues in 1974 [36]. Insulin was later shown to increase intracellular Ca^{2+} in normal human adipocytes[37] and in vascular smooth muscle cells[38], but not in a skeletal muscle cell line[39]. In liver cells, it was shown that the insulin-dependent stimulation of phosphodiesterases, of succinate oxidation and of protein synthesis was inhibited by the lack of external Ca^{2+} [40; 41]. In 1985, Strunecka presented indirect evidence that insulin elevated steady-state Ca^{2+} in digitonin-permeabilized rat hepatocyte suspensions[42]. Our laboratory recently demonstrated that insulin induces an influx of extracellular Ca^{2+} into primary cultures of rat hepatocytes

[17]. We also found that interference with insulin-induced Ca^{2+} movements, using external Ca^{2+} chelation or Ca^{2+} channel inhibitors, blocked the hormone's ability to stimulate MAPK activity[17]. These data are in line with recent evidence showing that MAPK activity in rat hepatocytes can be modulated by Ca^{2+} -dependent mechanisms[43] as seen in other epithelial cells [44]. Thus, our results strongly indicated that insulin-induced Ca^{2+} influx was a crucial component for at least part of the insulin signaling cascade in rat liver cells. We thus sought to determine if other components of this signaling cascade were also Ca^{2+} -dependent.

The early events occurring after insulin binding have been rather well documented in the liver of intact animals [45-47]. IRS-1 has been shown to be a major and direct substrate of the activated insulin receptor both in vivo and in vitro [9; 48]. IRS-1 has multiple potential tyrosine phosphorylation sites which, once phosphorylated, serve as intracellular binding sites for proteins containing SH2 domains [3; 6; 9; 49; 50]. For instance, tyrosine phosphorylation of IRS-1 leads to its association with the enzyme PI 3-kinase [3; 8; 9; 51] resulting in an increase in total PI 3-kinase activity in several cell types [3; 8; 9; 23; 24; 50]. Studies based on the use of the inhibitors wortmannin and LY294002 reported that PI 3-kinase is involved in the stimulation of glucose uptake and activation of glycogen synthase induced by insulin in either cultured hepatocytes or in the whole liver respectively[52-54]. Thus, the activation of PI 3-kinase by insulin in liver cells is physiologically relevant and we assessed the possible implication of Ca^{2+} in this insulin action.

The results presented herein confirm, by using a direct immune-complex enzyme assay, that PI 3-kinase activity is increased by insulin in primary hepatocytes, as seen previously for isolated rat adipocytes [24]. PI 3-kinase activity was also detected in the basal state. Time course data and insulin dose-response relationship show that hepatocyte PI 3-kinase responds rapidly to physiologically relevant concentrations of the hormone.

We next evaluated the implication of Ca^{2+} ions in the insulin-dependent stimulation of PI 3-kinase activity in isolated cultured rat hepatocytes. The results demonstrate that conditions previously shown to inhibit insulin-induced Ca^{2+} influx, namely EGTA, Ni^{2+} and Gd^{3+} , also blocked the stimulation of PI 3-kinase by the hormone, whereas verapamil was ineffective. This pharmacological profile is identical to the one we recently observed for the insulin-dependent stimulation of MAPK activity [17]. This strongly suggests that Ca^{2+} influx also plays an important role in PI 3-kinase activation, another major signaling pathway of insulin in liver cells [29].

We also evaluated the implication of Ca^{2+} movements in the insulin-induced phosphorylation of IR β -subunit and of IRS-1, two early steps in the insulin signaling cascade that have been defined at the molecular level and that are essential for mediating several biological responses to insulin. In contrast to PI 3-kinase, insulin-dependent tyrosine phosphorylation of IR β -subunit and of IRS-1 was unaffected by external Ca^{2+} chelation or by the Ca^{2+} -channel blockers Ni^{2+} and Gd^{3+} . One interpretation of our data

is thus that insulin-induced Ca^{2+} influx may intervene in the insulin signaling cascade between IRS-1 and downstream elements such as PI 3-kinase and MAPK.

Indeed, it was shown that PI 3-kinase activity may be modulated by Ca^{2+} [55] through a Ca^{2+} -dependent interaction of calmodulin directly with the p110 catalytic subunit of the enzyme[56], as was also seen with the SH2 domain of the p85 regulatory subunit[57]. Moreover, Ca^{2+} -dependent conformational changes of the N-terminal SH2 domain of p85 were reported to be important for PI 3-kinase binding to α -PDGF receptor [58] and Ca^{2+} ions were found to directly activate purified PI 3-kinases in bovine thymus [59].

A number of studies also point to a relationship between PI 3-kinase and MAPK pathways. For instance, wortmannin was shown to prevent the stimulation of MAPK isoform ERK-1 by insulin in a primary hepatocyte model similar to our own, suggesting that PI 3-kinase activity may lie upstream of MAPK in liver cells[60]. In addition, PI 3-kinase can form a complex with Ras [61] while expression of a constitutively active p110 catalytic subunit of PI 3-kinase can accentuate Ras-dependent cellular processes [62] including MAPK activation. Hence, it is possible that the insulin-induced influx of Ca^{2+} observed previously by our laboratory[17] stimulates PI 3-kinase activity which, in turn, triggers the MAPK cascade.

An interesting alternative explanation for our results would implicate recently identified Ca^{2+} -dependent tyrosine kinases of the focal adhesion kinase family, such as Pyk2[63], which are known to mediate Ca^{2+} -dependent MAPK activation in certain cell

types[64]. Pyk2 or Pyk2-like kinases appear to be activated early in receptor signaling cascades. For instance, Ca^{2+} -dependent tyrosine phosphorylation of SHC by Pyk2 has been reported [65] and downstream activation of both PI 3-kinase and MAPK could thus ensue. Hence, inhibition of insulin-induced Ca^{2+} influx by EGTA or channel blockers could prevent Pyk2 activation. Finally, although the phosphorylation of the insulin receptor and of IRS-1 are not affected by our experimental modulation of Ca^{2+} influx, our results do not rule out that prevention of Ca^{2+} influx may interfere with the formation of complexes between IRS-1 and other effectors such as GRB2 or the p85 regulatory subunit of PI 3-kinase. Further experiments will be necessary to elucidate the exact site of action of Ca^{2+} influx in the insulin signal transduction cascade.

The means by which insulin triggers Ca^{2+} influx into liver cells is also unclear. The pharmacological sensitivity of this influx and of insulin-stimulated PI 3-kinase and MAPK activities is compatible with that of non-selective cation channels present on hepatocytes[18]. It is thus possible that these channels mediate the effect of insulin on hepatocellular Ca^{2+} , as supported by our preliminary observations using the patch clamp technique[66]. Coupling between the insulin receptor and cation channels is not unprecedented since insulin was shown to activate a 10-pS calcium-permeable channel in CHO-IR cells[67]. Moreover, this coupling was physiologically relevant since Ni^{2+} inhibition of this channel abolished the effect of insulin on DNA synthesis[67].

In conclusion, our study demonstrates that interference of insulin-induced Ca^{2+} influx into primary rat hepatocytes prevents the activation of PI 3-kinase by the hormone but not the associated tyrosine phosphorylation of insulin receptor β -subunit or of IRS-1.

Hence, Ca^{2+} ions may intervene in the insulin signaling cascade downstream of IRS-1 or at an independent site upstream of both PI 3-kinase and MAPK in hepatocytes. Our studies are within the physiological framework since both PI 3-kinase and MAPK activities were shown to be important for the stimulation of glycogen synthesis by insulin in liver cells [54]. Our results thus support the notion that insulin-induced Ca^{2+} movements are a crucial part of the physiological action of this hormone in the liver.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (Grant no. MA-11298), from the Canadian Diabetes Association and from the Fonds pour la Formation des chercheurs et l'aide à la Recherche (F.C.A.R.; Grant no. 97-ER-2116). K.B. was the recipient of a studentship from the Groupe de Recherche en Transport Membranaire made possible by infrastructure grants from the F.C.A.R. and the Université de Montréal. P.H. is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec. The authors wish to express their gratitude to Ms. Elisabeth Peres for excellent assistance with graphic art.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 **Time-course of stimulation of PI 3-kinase activity by insulin.** Isolated rat hepatocytes were incubated in the presence of 10 nM insulin for 1,3,5,10, and 15 min. Cells were lysed and the protein lysates were immunoprecipitated with p85-antibody as described in Materials and Methods. The immunocomplex was assessed for PI 3-kinase activity using phosphatidylinositol as substrate as described in Materials and Methods. Data points are the mean \pm SEM of 8 separate experiments and are expressed in relation to respective baseline values obtained for each experiment (different hepatocyte preparation).

Figure 2 **Dose-dependent effect of insulin on PI 3-kinase activity.** Isolated hepatocytes were incubated with various concentrations of insulin (0, 0.1, 1, 10, 100 nM) for 3 min at 37°C. PI 3-kinase activity was measured as described in Materials and Methods. The data shown are the mean \pm SEM of 6 separate experiments and are expressed in relation to respective baseline values obtained for each experiment (different hepatocyte preparation).

Figure 3 **Effects of extracellular calcium chelation (EGTA) and of calcium channel inhibitors on insulin-induced PI 3-kinase activity.** Primary rat hepatocytes were pretreated for 15 min with or without EGTA or the specified Ca²⁺ channel inhibitors at the indicated concentrations before stimulation with 10 nM insulin for 3 min. (A) Cells lysates were prepared and proteins were immunoprecipitated with anti-

p85-antibody, the immunocomplex was assayed for PI 3-kinase activity using PI as substrate and ^{32}P -ATP. The labelled phospholipids were resolved by thin layer chromatography then exposed to x-ray film. An autoradiogram of a representative experiment is shown. Arrow heads indicate the origin and the position of the phosphorylated phosphoinositide products (PIP). **(B)** PIP's formed in the above experiment were quantified with a phosphorimager. Results are presented as the mean \pm SEM of 8 experiments and are expressed in relation to baseline values obtained in respective controls. Differences between treatment groups were determined by analysis of variance. * significantly different from insulin, † significantly different from control, $p < 0.002$.

Figure 4 **Effects of external Ca^{2+} chelation and of Ca^{2+} channel inhibitors on insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation.** Primary rat hepatocytes were pretreated for 15 min with the various agents at the indicated concentration before stimulation with 10 nM insulin for 3 min. The cells were lysed and then subjected to immunoprecipitation with an antibody to IRS-1 followed by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody. **(A)** Representative immunoblot of 8 experiments with similar results. **(B)** The tyrosine phosphorylation of IRS-1 bands were quantified by densitometric analysis using NIH imager. Results are expressed as the mean \pm SEM of 8 experiments.

Figure 5 **Effects of external Ca^{2+} chelation and of Ca^{2+} channel inhibitors on insulin induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor.** The cells were treated

as described in figure 4. The cells were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-human antibody to IR β -subunit followed by immunoblotting with anti phosphotyrosine antibody as described in Materials and Methods. **(A)** The immunoblot is representative of one of 6 independent experiments with similar results. **(B)** The bands were quantified as described in figure 4. Results are expressed as the mean \pm SEM of 6 experiments.

REFERENCES

1. Rosen, O.M. (1987) *Science* 237, 1452-1458.
2. Kasuga, M., Karlsson, F.A. and Kahn, C.R. (1982) *Science* 215, 185-187.
3. Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J. and White, M.F. (1991) *Nature* 352, 73-77.
4. Maegawa, H., Olefsky, J.M., Thies, S., Boyd, D., Ullrich, A. and McClaim, D.A. (1988) *J.Biol.Chem.* 263, 12629-12637.
5. Ebina, Y., Araki, E., Taira, M., Shimada, F., Morri, M., Craik, C.S., Siddle, K., Pierce, S.B., Roth, R.A. and Rutter, W.J. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 704-708.
6. Lavan, B.E., Kuhne, M.R., Garner, C.W., Anderson, D., Reedijk, M., Pawson, T. and Lienhard, G.E. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 11631-11636.
7. Sun, X.-J., Miralpeix, M., Myers, M.G.J., Glasheen, E., Backer, J.M., Kahn, C.R. and White, M.F. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 22662-22672.
8. Hadari, Y.R., Tzahar, E., Nativ, O., Rothenberg, P., Roberts, C.T.Jr., LeRoith, D., Yarden, Y. and Zick, Y. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 17483-17486.

9. Backer, J.M., Myers, M.G.Jr., Shoelson, S.E., Chin, D.J., Sun, X.J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E.Y., Schlessinger, J. and White, M.F. (1992) *EMBO J.* 11, 3469-3479.
10. Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C.L., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. and Soltoff, S. (1991) *Cell* 64, 281-302.
11. Hiles, I.D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M.J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-larrea, F. and Thompson Totty, N.F. (1992) *Cell* 70, 419-429.
12. Cheatham, B., Vlahos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. and Kahn, C.R. (1994) *Mol.Cell.Biol.* 14, 4902-4911.
13. Shepherd, P.R., Nave, B.T. and Siddle, K. (1995) *Biochem.J* 305, 25-28.
14. Gabbay, R.A., Sutherland, C., Gnudi, L., Kahn, B.B., O'brien, R.M., Granne, D.K. and Flier, J.S. (1996) *J.Biol.Chem.* 271, 1890-1897.
15. Osawa, H., Sutherland, C., Robey, R.B., Printz, R.L. and Granne, D.K. (1996) *J.Biol.Chem.* 271, 16690-16694.
16. Agius, L., Peak, M., Beresford, G., Al-Habori, M. and Thomas, T.H. (1994) *Biochem.Soc.Trans.* 22, 516-522.
17. Benzeroual, K., Van de Werve, G., Meloche, S., Mathé, L., Romanelli, A. and Haddad, P. (1997) *Am.J.Physiol.* 272, G1425-G1432
18. Lidofsky, S.D. (1995) *Hepatology* 22, 306A(Abstract)
19. Lidofsky, S.D., Xie, M.H., Sostman, A., Scharschmidt, B.F. and Fitz, J.G. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 14632-14636.
20. Haimovici, J., Beck, J.S., Vallerand, D., Molla-Hosseini, C. and Haddad, P. (1994) *Am.J.Physiol.* 267, G364-G370
21. Fukui, Y. and Hanafusa, H. (1989) *Mol.Cell.Biol.* 9, 1651-1658.
22. Pandey, S.K., Anand-Srivastava, M.-B. and Srivastava, A.K. (1998) *Biochemistry* 37, 7006-7014.
23. Ruderman, N.B., Kapeller, R., White, M.F. and Cantley, L.C. (1990) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87, 1411-1415.
24. Kelly, K.L., Ruderman, N.B. and Chen, K.S. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 3423-3428.
25. D'Onofrio, F., Le, M.Q., Chiasson, J.L. and Srivastava, A.K. (1994) *FEBS Lett.* 340, 269-275.

26. Lypedjian, P.B., Jotterand, D., Nospiket, T. and et al (1989) *J.Biol.Chem.* 9, 1651-1989.
27. Morin, O., Fehlmann, M. and Freychet, P. (1982) *Mol.Cell.Endocrinol.* 25, 339-352.
28. Karam, J.H. (1995) in *Basic and Clinical Pharmacology* (Katzung, B.G., ed.), pp. 637-654, Prentice Hall Canada, toronto.
29. Folli, F., Saad, M.J.A., Backer, J.M. and Kahn, C.R. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 22171-22177.(Abstract)
30. Kass, G.E.N., Llopis, J., Chow, S.C., Duddy, S.K. and Orrenius, S. (1990) *J.Biol.Chem.* 265, 17486-17492.
31. Nathanson, M.H., Gautam, A., BRUCK, R., Isales, C.M. and Boyer, J.L. (1992) *Hepatology* 15, 107-116.
32. Bear, C. and Li, C. (1991) *Am.J.Physiol.* 261, C1018-C1024
33. Berven, L.A., Hughes, B.P. and Barritt, G.J. (1994) *Biochem.J.* 299, 399-407.
34. Fernando, K.C. and Barritt, G.J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1268, 97-106.
35. Catterall, W.A. and Striessnig, J. (1992) *Trends Pharmacol.Sci.* 13, 256-262.
36. Clausen, T., Elbrink, J. and Martin, B.R. (1974) *Acta Endocrinol.* 191, 137-143.
37. Draznin, B., Sussman, K.E., Eckel, R.H., Kao, M., Yost, T. and Sherman, N.A. (1988) *J.Clin.Invest.* 82, 1848-1852.
38. Touyz, R.M. and Schiffrin, E.L. (1994) *Hypertension* 23, 931-935.
39. Klip, A., Li, G. and Logan, W.J. (1984) *Am.J.Physiol.* 247, E297-E304
40. Rogers, K.S., Menon, R.A., Mohan, C., Geiger, P.J. and Bessman, S.P. (1991) *Biochem.Med.Metab.Biol.* 45, 344-349.
41. Irvine, F., Wallace, A.V., Sarawak, S.R. and Houslay, M.D. (1993) *Biochem.J.* 293, 249-253.
42. Strunecka, A. (1985) *Gen.Physiol.Biophys.* 4, 505-516.
43. Romanelli, A. and Van de Werve, G. (1997) *Metabolism* 46, 548-555.

44. Chao, T.-S.O., Byron, K.L., Lee, K.-M., Villereal, M. and Rosner, M.R. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 19876-19883.
45. Saad, M.J., Folli, F. and Kahn, C.R. (1993) *J.Clin.Invest.* 92, 2065-2072.
46. Tobe, K., Kadowaki, T., Hara, K., Gotoh, Y., Kosako, H., Matsuda, S., Tamemoto, H., Ueki, K., Akanuma, Y., Nishida, E. and Yazaki, Y. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 21089-21097.
47. Ito, Y., Takahashi, S.I., Hidaka, T. and Noguchi, T. (1997) *J.Endocrinol.* 154, 267-273.
48. Rothenberg, P., Lane, W.S., Karasik, A., Backer, J., White, M.F. and Kahn, C.R. (1991) *J.Biol.Chem.* 266, 8302-8311.
49. White, M.F. and Kahn, C.R. (1994) *J.Biol.Chem.* 269, 1-4.
50. Yonesawa, K., Ueda, H., Hara, K., Nishida, K., Ando, A., Chavanieu, A., Matsuba, H., Shii, K., Yokono, K., Fukui, Y., Calas, B., Grigorescu, F., Dhand, R., Gout, I., Otsu, M., Waterfield, M.D. and Kasuga, M. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 25958-25966.
51. Kapeller, R., Chen, K.S., Yoakin, M., Schaffhausen, B.S., Backer, J.M., White, M.F., Cantley, L.C. and Ruderman, N.B. (1991) *Mol.Endocrinol.* 5, 769-777.
52. Le Marchand-Brustel, Y., Gautier, N., Cormont, M. and Van Obberghen, E. (1995) *Endocrinology* 136, 3566-3570.
53. Tsakiridis, T., McDowell, H.E., Walker, T., Downes, C.P., Hundal, H.S., Vranic, M. and Klip, A. (1995) *Endocrinology* 136(10), 4314-4322.
54. Carlsen, J., Christiansen, K. and Vinten, J. (1997) *Cell.Signal.* 9, 447-450.
55. Singh, S.S., Chauhan, A., Brockerhoff, H. and Chauhan, V.P. (1995) *Life Sci.* 57, 685-694.
56. Fischer, R., Julsgart, J. and Berchtolt, M.W. (1999) *FEBS Lett.* 425, 175-177.
57. Joyal, J.L., Burks, D.J., Pons, S., Matter, W.F., Vlahos, C.J., White, M.F. and Sacks, D.B. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 28183-28186.
58. Mahadevan, D., Thanki, N., McPhie, P., Beeler, J.F., Yu, J.-C., Wlodawer, A. and Heidarani, M.A. (1994) *Biochem.* 33, 746-754.
59. Shibasaki, F., Homma, Y. and Takenawa, T. (1991) *J.Biol.Chem.* 266, 8108-8114.

60. Band, C.J. and Posner, B.I. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 138-145.
61. Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesbroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J. (1994) *Nature* 370, 527-532.
62. Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J. and William, L.T. (1995) *Science* 268, 100-102.
63. Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B. and Schlessinger, J. (1995) *Nature* 376, 737-745.
64. Luttrell, L.M., Daaka, Y. and Lefkowitz, R.J. (1999) *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 177-183.
65. Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R. and Sieg, D.J. (1999) *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 71, 435-478.
66. Mathé, L., Vallerand, D. and Haddad, P. (1997) *Hepatology* 26, 263A(Abstract)
67. Nie, L., Kanzaki, M., Shibata, H. and Kojima, I. (1998) *Endocrinology* 139, 179-188.

Figure 1

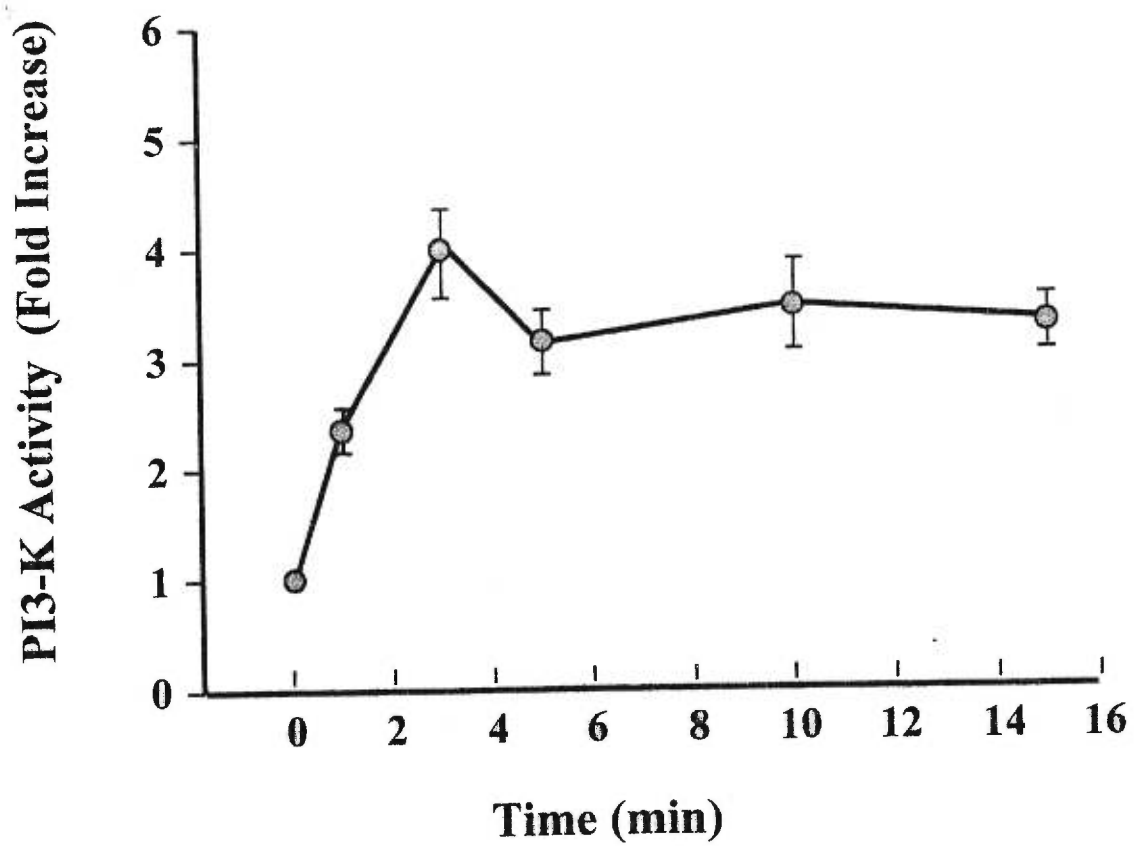


Figure 2

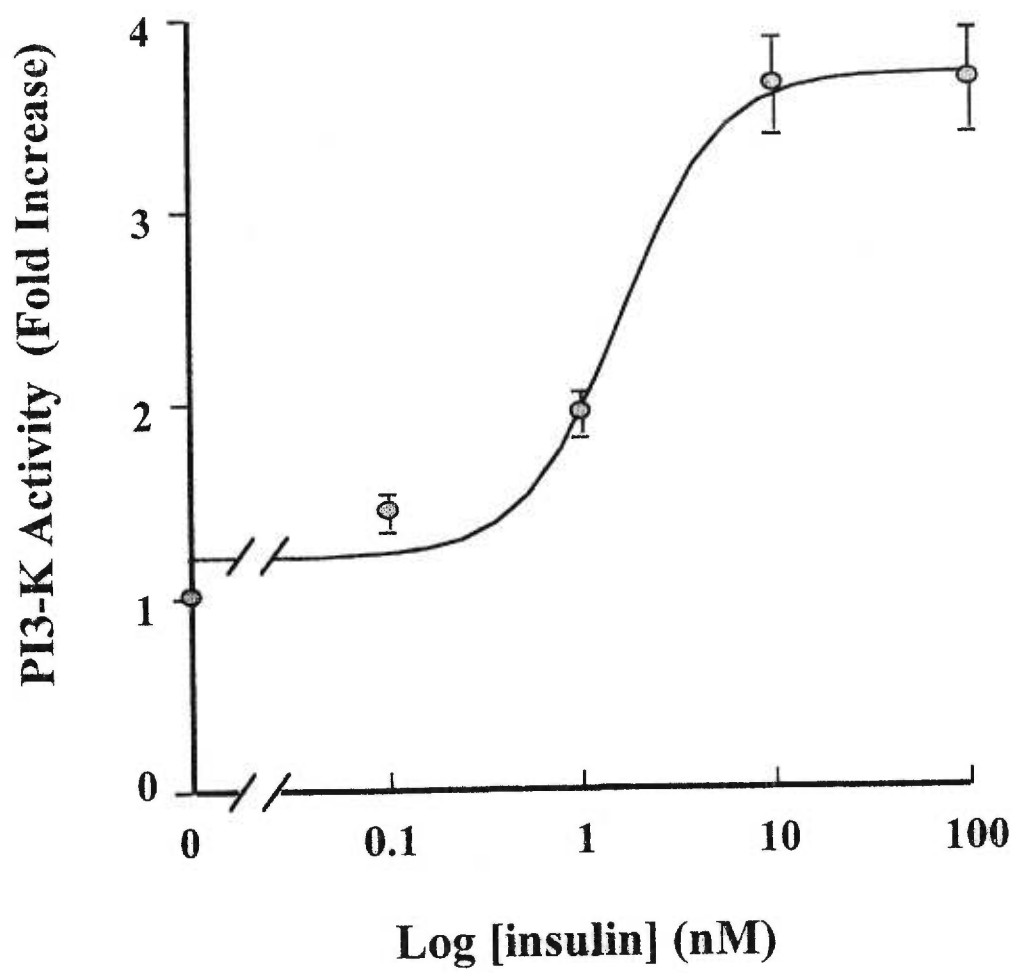


Figure 3

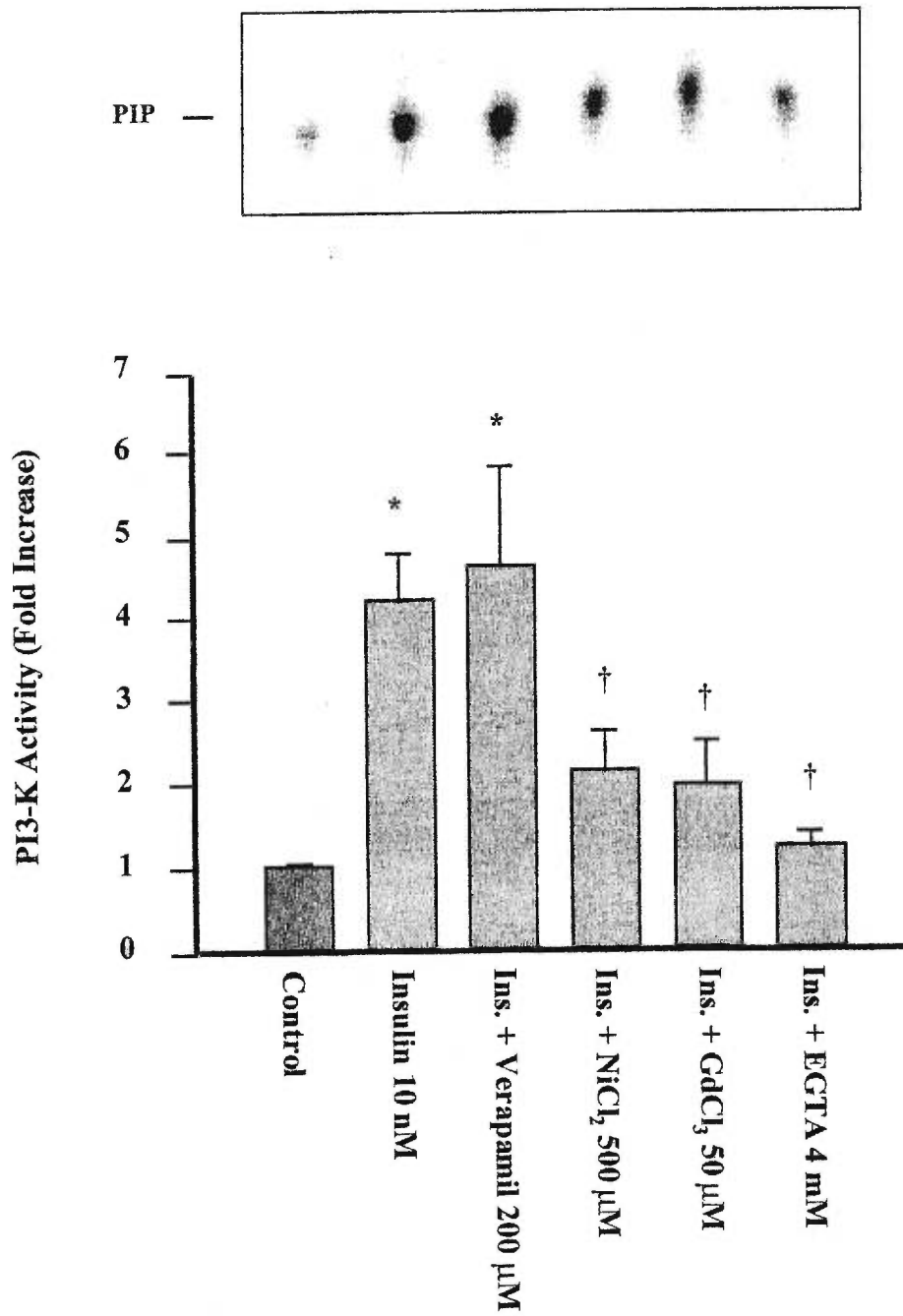


Figure 4

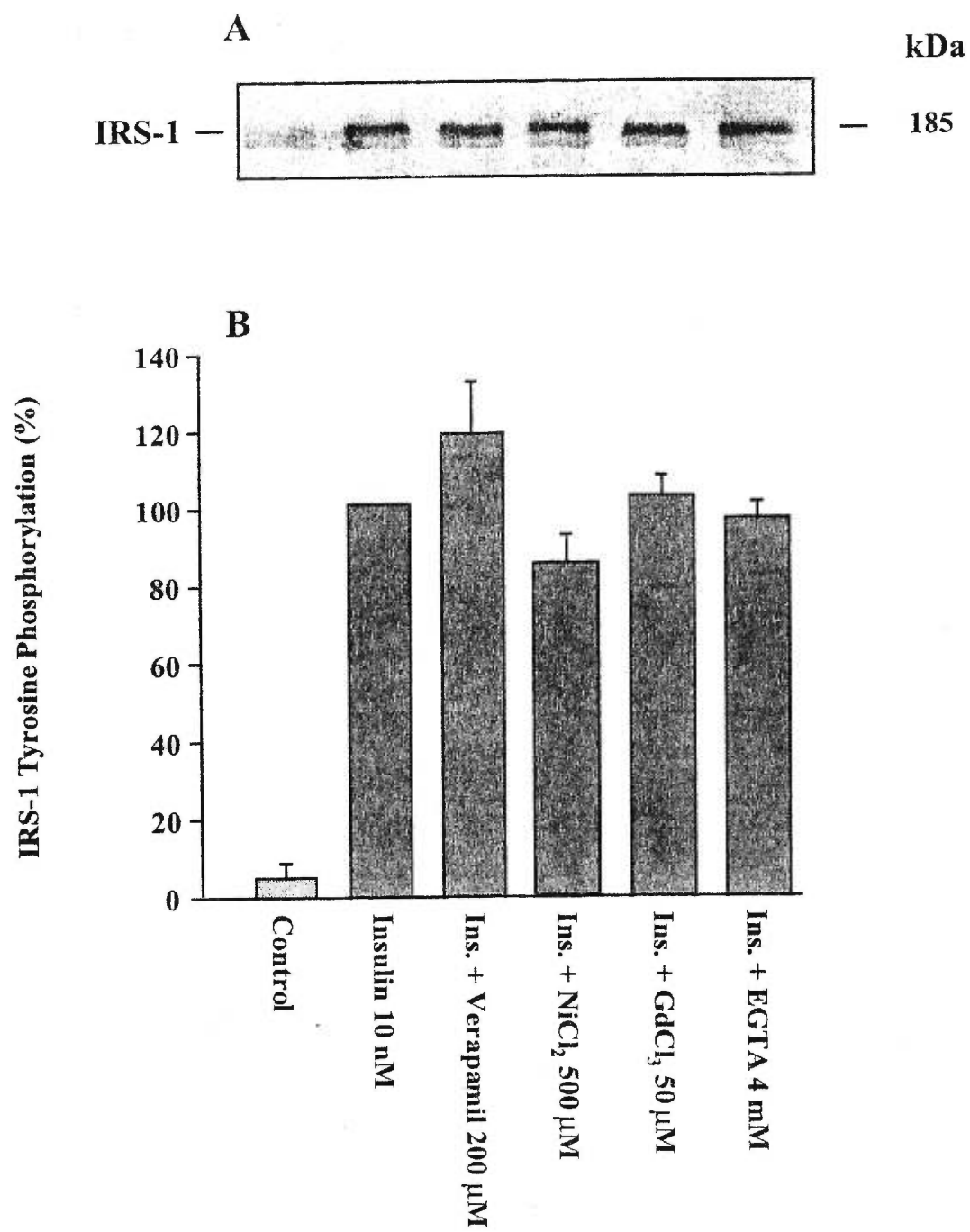
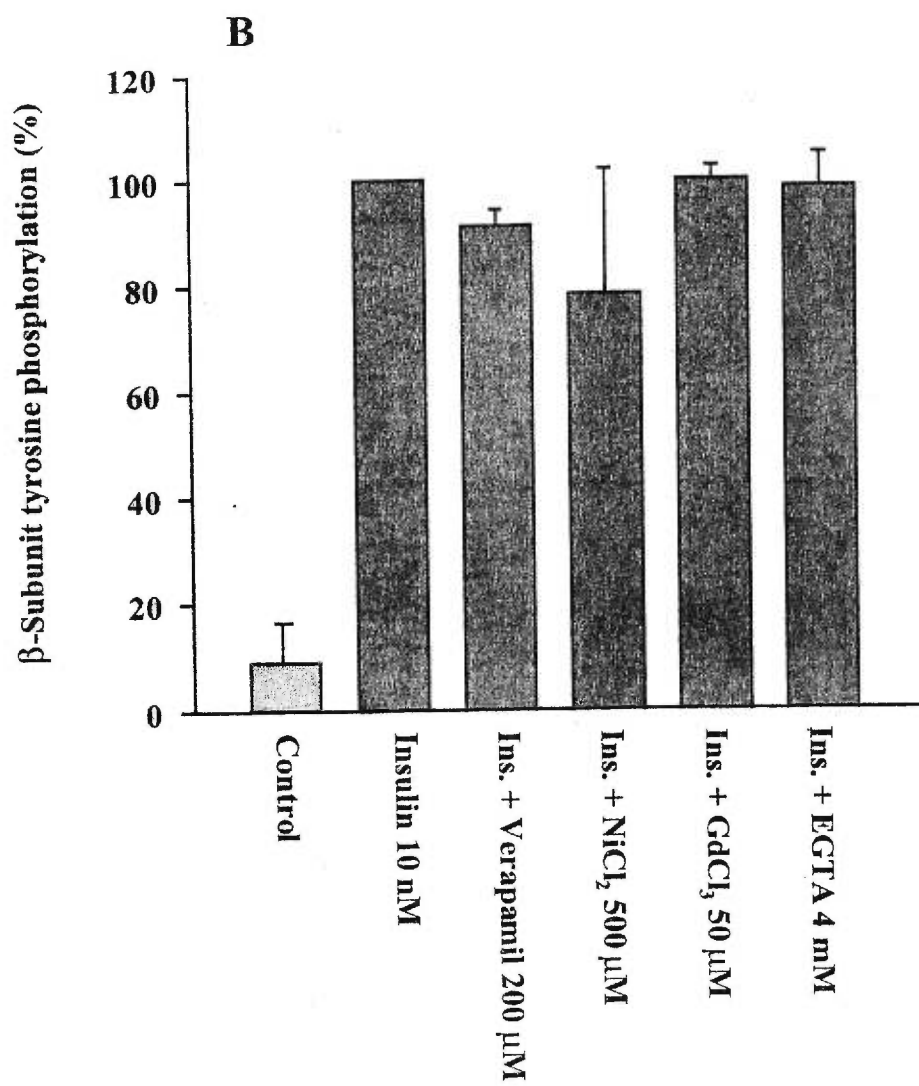
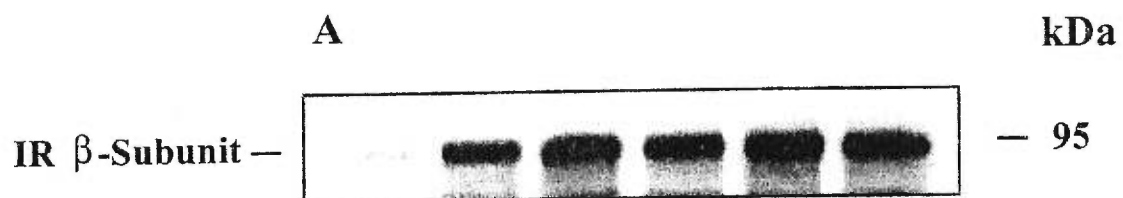


Figure 5



5.3 Article 3

Interaction between insulin and purinergic agonist ATP at the level of membrane potential, cytosolic calcium and MAP kinase in the HTC liver cell line

Par

Kenza Benzeroual, Laurence Mathé, Diane Vallerand, Gérald van de Werve, et Pierre Haddad

Étant donné que l'insuline antagonise les effets des hormones cataboliques dans le foie et que des études préalables de notre laboratoire ont montré que l'insuline augmente la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules HTC, nous avons étudié l'implication de l'influx de calcium dans l'effet interactif entre l'insuline et l'ATP sur les cellules HTC. Nos études montrent que l'insuline inhibe la dépolarisation rapide causée par l'ATP. En effet, cette dépolarisation rapide est reliée à l'activation des CCNS. Les études en fluorescence appuient l'hypothèse que ceci est dû à un antagonisme au niveau de l'influx plutôt qu'à un effet sur la mobilisation de calcium à partir des réserves intracellulaires en réponse à l'ATP. Dans un protocole de retrait et de ré-admission de calcium extracellulaire, l'insuline diminue la vitesse initiale d'entrée de calcium induite par la vidange des réserves intracellulaires après stimulation par l'ATP exogène mais non après celle causée par la thapsigargine. Ces effets antagonistes sont peut être médiés par un mécanisme commun, soit l'activation de la PKC par l'insuline. En effet, il a été montré au préalable que les CCNS sont inhibés par la PKC. Même si la voie MAPK a été étudiée dans les hépatocytes en réponse à l'insuline et aux RCPGq (Benzeroual et al., 1997; Romanelli et van de Werve, 1997) à notre connaissance ce travail est le premier qui montre que la MAPK est phosphorylée en réponse à l'insuline et à l'ATP dans les cellules HTC. Cette activation dépend en partie de la présence du calcium extracellulaire. Le prétraitement des cellules avec l'insuline, diminue significativement la phosphorylation de la MAPK en réponse à l'administration subséquente de l'ATP. Nos résultats suggèrent donc que l'action de l'insuline sur les voies d'entrée de calcium participe dans l'antagonisme physiologique des réponses aux RCPGq dans le foie au niveau membranaire et intracellulaire.

INTERACTION BETWEEN INSULIN AND PURINERGIC AGONIST ATP AT THE LEVEL OF MEMBRANE POTENTIAL, CYTOSOLIC CALCIUM AND MAP KINASE IN THE HTC LIVER CELL LINE

Kenza BENZEROUAL^{1,2}, Laurence MATHE^{1,2}, Diane VALLERAND^{1,2}, Gérald VAN DE WERVE^{1,3,4} and Pierre S. HADDAD^{1,2}

Groupe de recherche en transport membranaire¹, Départements de Pharmacologie² et de Nutrition³, Université de Montréal et Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Campus Notre-Dame⁴, Montréal, Québec, Canada.

SHORT TITLE : Crosstalk between insulin and calcium mobilizing agonist.

INDEX TERMS : Hepatocyte, Patch clamp, Fura-2, MAPK.

ADDRESS FOR CORRESPONDANCE

Pierre HADDAD, Ph.D.
Groupe de recherche en transport membranaire et
Département de Pharmacologie
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Downtown Station
Montréal (Québec)
Canada H3C 3J7

Telephone : (514)-343-6590
Fax : (514)-343-2291
E-mail : pierre.haddad@umontreal.ca
URL: <http://www.pharmco.umontreal.ca/Haddad.htm>

ABSTRACT

Background/Aims: Insulin induces an influx of Ca^{2+} into isolated rat hepatocytes, an action important to couple the tyrosine kinase receptor to MAPK activity. We examined the interactive effects of insulin and $\text{P}_{2\text{U}}$ purinergic agonist ATP on membrane potential, cytosolic Ca^{2+} and MAPK activity. *Methods:* In rat hepatoma HTC cells, membrane potential was measured by whole-cell patch clamp, cytosolic Ca^{2+} by FURA-2 fluorescence and MAPK activation by specific phosphoprotein antibodies. *Results:* Pretreatment with 10 nM insulin significantly decreased the rapid depolarization induced by 100 μM ATP, known to reflect non-selective cation influx. Similarly, insulin diminished the compound Ca^{2+} response to ATP. Ca^{2+} influx was measured by external Ca^{2+} withdrawal and re-admission. ATP or thapsigargin administration during Ca^{2+} -free perfusion doubled the rate of Ca^{2+} influx upon Ca^{2+} re-admission. Insulin increased this influx 1.32-fold. Pretreatment with insulin inhibited the ATP-induced stimulation of Ca^{2+} influx without affecting internal store mobilization. However, insulin did not affect thapsigargin-mediated effects. Insulin induced a dose-dependent phosphorylation of p44/42 MAPK. This action depended in part on Ca^{2+} influx as assessed using the Ca^{2+} -chelator EGTA. Similar results were obtained with ATP. Pretreatment with insulin significantly diminished the MAPK response to ATP to the same level as with EGTA. *Conclusions:* Insulin antagonizes the Ca^{2+} response to ATP by interfering with Ca^{2+} influx pathways. This influx is important for the full expression of signaling events to MAPK by G-coupled purinergic receptors.

INTRODUCTION

Insulin is the predominant anabolic hormone that acts on the liver to promote glucose storage and utilization, and to antagonize the action of catabolic hormones, particularly at the level of glucose metabolism. In addition, insulin promotes cation influx into liver cells that is important for its metabolic actions¹. Recent results from our laboratory have demonstrated that insulin itself increases steady-state intracellular Ca^{2+} and that this is important to couple the tyrosine kinase receptor to mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) activities in isolated rat hepatocyte couplets^{2;3}. However, G_q -coupled receptor agonists also increase intracellular Ca^{2+} . They exert this action through mobilization of intracellular Ca^{2+} stores followed by increased Ca^{2+} influx^{4;5} (Blackmore et Exton, 1986; Bear et Li, 1991; Fitz et al., 1994; Altin et Bygrave, 1987). This effect is known to participate in hormonal catabolic actions on hepatic glucose metabolism (Kraus-Friedmann, 1984; Pilkis et Granner 1992). For instance, extracellular nucleotides such as UTP and ATP act on liver cells mainly via purinergic P_{2U} receptors^{6,8} and trigger IP_3 formation, intracellular Ca^{2+} mobilization and activation of glycogen phosphorylase in both rat⁷ and human⁹ hepatocytes. Indeed, the catabolic effects of ATP are comparable to those of α -adrenergic agonists in hepatocytes of both species^{7;9}.

Since liver glucose metabolism is tightly regulated by the opposing effects of catabolic and anabolic hormones, we wanted to study the interactive effect of insulin and ATP at the level of membrane potential, cytosolic Ca^{2+} and MAPK activity. Indeed, insulin

induces a slow and reversible depolarization of membrane potential in cultured hepatocytes¹⁰ and in HTC cells¹¹. In contrast, ATP triggers a tri-phasic membrane potential response in HTC cells where the initial rapid depolarization is due to a non-selective cationic current¹². Insulin was also shown to antagonize glucagon-induced hyperpolarization in the isolated perfused rat liver and this participates in its inhibition of gluconeogenesis¹³. Others have demonstrated that insulin inhibits glucagon-induced phosphorylase activation in isolated perfused rat liver¹⁴ and diminishes the Ca^{2+} response induced by G_q -coupled receptor agonists in primary rat hepatocytes^{15;16}. However, the mechanisms by which insulin exerts its antagonistic action on the Ca^{2+} response of G_q -coupled receptor agonists in liver cells as well as the impact on downstream signaling events remain unclear.

HTC cells represent a particularly interesting model in which to address such questions. Several observations suggest that HTC cells reflect the behavior of primary hepatocytes. For instance, This cell line possess non-selective cation current (NSCC) similar to primary rat hepatocytes^{17;18} and are more amenable than the latter to patch clamp electrophysiological analysis⁶. In addition, HTC cells express insulin receptors¹⁹ and possess the major components of the insulin receptor signaling cascade²⁰. Moreover, the relative abundance of PKC isoforms in HTC cells closely resembles that of hepatocytes²¹. Finally, our own work has demonstrated that both insulin and ATP increase cytosolic Ca^{2+} in HTC cells¹¹ as is the case in rat hepatocytes^{2;7}. Thus, the aim of the present work was to study the interaction between insulin and Ca^{2+} -mobilizing agonist ATP at the membrane and cellular levels in the HTC rat hepatoma cell line.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Phospho-specific p44/42 MAP Kinase (Thr 202/Tyr 204) antibody kit was purchased from New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) and was chosen because it detects p44 and p42 MAP Kinase (Erk1 and Erk2) only when catalytically activated by phosphorylation at Thr202 and Tyr204. Bovine insulin, aprotinin, as well as other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2 AM) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR).

Cell culture

Rat hepatoma HTC cells were chosen because they express surface membrane channels very similar to those found in primary cultures of rat hepatocytes while offering a greater stability for measurements of membrane currents by the patch clamp method^{6,17}. Dr. J. Gregory Fitz of the Colorado Health Science Center (Denver, CO) kindly provided HTC cells. They were maintained on minimum essential medium (MEM) containing 25 mM HCO₃⁻, 2 mM glutamine, 5% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ / 95 % air. All experiments were conducted on cells at in-house passages 4-9. For MAPK experiments, cells were grown to confluence in 100 mm plastic tissue culture dishes and incubated in MEM containing 0.5% serum for 16-20 hr prior to experiment. For all other experiments, cells were grown for 24 hr on 22 mm round glass coverslips.

Cell lysis and immunoblotting

The confluent HTC cells were serum-deprived and then treated with the concentrations of insulin and ATP specified in the figure legends. Cells treated with the vehicle of these hormones were used as controls. To assess the effect of 4 mM EGTA, this agent was administered 15 min before and throughout the insulin and/or ATP challenge. The incubation was stopped by quickly removing the medium and washing the cells twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Petri dishes were then quickly frozen on liquid nitrogen and stored at -80°C pending the enzyme assay. Cells were lysed in 0.8 ml of lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM NaCl, 1 mM Na ortho-vanadate, 10 mM Na fluoride, 10 mM Na pyrophosphate, 20 mM okadaic acid, 0.5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100). Cell lysates were scraped from the plates and clarified by centrifugation at 12,000 X g for 12 min. The solubilized fraction was submitted to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels. The proteins were electrophoretically transferred from the gel to PVDF membranes in 25 mM Tris and 0.2 M glycine and 20% methanol. For immunoblotting of phosphorylated proteins, membranes were blocked in TBS containing 0.1% Tween-20 and 5% non fat dry milk for 1-3 hours at room temperature before incubation overnight at 4°C with phospho-specific p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) antibody (1:3000) that recognizes only the activated Erk1/2 (t408,13) in the same blocking solution described above. The membranes were washed three times with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2000) in blocking buffer for 1 hour. The membrane was washed as described after incubation with phospho-specific MAPK antibody. The proteins were detected by enhanced

chemiluminescence kit according to the manufacturer's instructions (New England BioLabs, Beverly, MA). Band intensities were quantified by scanning densitometry of the developed autoradiograms.

Patch Clamp Recording

Membrane currents were measured at room temperature using standard patch clamp recording techniques²². Coverslips with adhered HTC cells were placed in a plastic perfusion chamber (100 μ l trough) set on the stage of an inverted microscope (Olympus IMT-2, Carsen Medical, Markham, ON) and single cells were selected for study. Cells were continuously superfused (\sim 2 ml/min) with a bath solution (138 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES-NaOH, 5 mM D-glucose, 1 mM Na-pyruvate, pH 7.4) at room temperature. An 8-way solenoid valve allowed rapid administration and washout of pharmacological agents. Patch pipettes typically exhibited resistances of 4-6 Mohm filled with standard pipette solution (140 mM KCl, 1.2 MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.35). All solutions were filtered through 0.22 μ m cellulose membranes prior to use.

Whole cell recordings were carried out using the perforated patch method described by Horn and Marty (Horn and Marty, 1988). Briefly, the tip of the pipette was capillary filled with the appropriate pipette solution (\sim 3 sec immersion) and the rest of the pipette was then backfilled with the same solution containing nystatin (200 μ g/ml). After formation of a seal between the pipette and cell membrane, the membrane potential was held at -40 mV until continuity with the cell interior was fully established (20-40 min),

as evidenced from capacitative transients induced by short 20 mV voltage steps given every 5 min. Membrane potential was measured in the current clamp ($I=0$) mode. After giga-seal formation, electrical signals were amplified and filtered (3 kHz) with a L/M-EPC-7 patch clamp amplifier (Medical Systems Corp., Greenvale, NY), continuously monitored on an oscilloscope and displayed on a chart recorder. Simultaneously, currents were digitized using a two-channel A/D converter (Instrutech, Elmont, NY) and recorded on standard VHS video magnetic tape. A TL-1 DMA Interface and the PClamp software (v.5.5.1) were used for data acquisition and PClamp v.6.0 was used for data analysis (Axon Instruments, Foster City, CA).

Intracellular Calcium Measurement

HTC cells were loaded with 1.5 μM Fura-2AM for 45 min at room temperature in bicarbonate-free MEM medium. Coverslips with adhered cells were transferred into a 100 μl plastic chamber placed on the stage of an inverted microscope coupled to a spectrofluorimeter (Deltascan RF-D4010, Photon Technology International Inc., London, ON). Cells were perfused at a flow rate of 2-3 ml/min with standard buffer (see above) at room temperature. Excitation wavelengths were 350 and 380 nm while fluorescence emission was measured at 505 nm. Intracellular dye calibration was performed *in situ* by perfusion of 3.5 μM ionomycin containing either 4 mM EGTA (R_{min} , 350/380 fluorescence ratio in Ca^{2+} -free solution) or 4 mM CaCl_2 (R_{max} , 350/380 fluorescence ratio at saturating Ca^{2+}). Once corrected for autofluorescence, the fluorescence ratios (350/380) were transformed into Ca^{2+} concentrations using the OSCAR software supplied by Photon Technology International Inc. (London, ON).

Statistical Analysis

Significant differences between group means were evaluated by analysis of variance or by paired or unpaired Students' t-test as appropriate using the SigmaStat software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

RESULTS

Interaction between insulin and ATP in HTC cells at the membrane level.

We first carried out whole-cell patch clamp recordings to study the effects of insulin on membrane potential changes induced by the Ca^{2+} -mobilizing agonist, ATP. In the current clamp mode, 100 μM ATP induced a typical triphasic response of membrane potential (V_m) as previously described in these cells by Fitz and Sostman¹². As observed by these authors, the initial rapid depolarisation (representing cation influx through non-selective channels) was seen in 84% (26/31) of cases¹². When insulin (10 nM) was present 5 min prior to and throughout the subsequent 5 min administration of ATP, the initial rapid depolarization was observed in only 50% (8/16) of cases ($p < 0.05$ by Chi square test). Figure 1 illustrates the membrane potential changes (relative to steady-state V_m) obtained with ATP, in the presence or absence of insulin, for experiments where an initial depolarization was observed. With ATP alone (Figure 1, filled circles), the rapid initial depolarization averaged $18 \pm 3 \text{ mV}$ ($n=26$) while the subsequent repolarization peaked at $-4 \pm 3 \text{ mV}$ ($n=31$). As previously reported, insulin 10 nM decreases baseline

cells V_m^{11} and the curve thus starts at a depolarized value (Figure 1, open triangles). In the continued presence of insulin, the ATP-induced rapid depolarization was decreased to $14 \pm 2\text{mV}$ ($n=8$) but this effect did not reach statistical significance. If the rapid depolarization is expressed in relation to the V_m observed immediately before ATP addition, the initial depolarization reduces to only $12 \pm 2\text{mV}$ in the presence of insulin as opposed to $18 \pm 3\text{mV}$ with ATP alone ($p < 0.05$).

Interaction between insulin and ATP in HTC cells at the level of cytosolic Ca^{2+} homeostasis.

We also verified the effects of insulin on ATP-induced Ca^{2+} responses. As shown in figure 2, we used a protocol where two 2-minute pulses of $100 \mu\text{M}$ ATP were administered to HTC cells at an interval of five minutes. In such conditions, the second ATP response (evaluated as the area under the Ca^{2+} -versus-time curve - AUC) amounted to $79 \pm 6\%$ of the first one ($n=26$, Figure 2A). In a second set of experiments, one minute prior to the second ATP pulse, cells were perfused with 10 nM insulin which was also present throughout the subsequent ATP administration. Such co-administration of insulin (10nM) decreased the second ATP compound Ca^{2+} response to $56 \pm 3\%$ of the first one ($n=42$, Figure 2B, $p < 0.001$) when compared to controls without insulin. This confirms, in HTC cells, the previously described inhibitory effects of insulin on responses to Ca^{2+} -mobilizing agonists in primary rat hepatocytes¹⁵.

Finally, we used a protocol of Ca^{2+} withdrawal and re-admission²³ to study the interactive effect of insulin with the Ca^{2+} influx triggered by internal store depletion.

Administration of 100 μM ATP in Ca^{2+} -free conditions (one minute prior to and throughout the subsequent Ca^{2+} re-admission) induced a sharp transient rise in cytosolic Ca^{2+} as expected from mobilization of internal pools (not illustrated) and doubled the initial rate of Ca^{2+} influx upon external Ca^{2+} re-admission (Table 1). When introduced one minute prior to ATP in Ca^{2+} -free conditions, insulin (10 nM) did not affect the mobilization of internal stores by the purinergic agonist as evaluated by the area under the Ca^{2+} -versus-time curve ($3.2 \pm 0.9 \mu\text{M}$ versus control value of $4.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$, N.S.). However, in the continued presence of insulin, ATP failed to increase the slope of the Ca^{2+} influx upon re-admission of extracellular Ca^{2+} (Table 1). Similar experiments were carried out with thapsigargin 0.5 μM to deplete intracellular Ca^{2+} stores without the intervention of second messengers. Co-administration of insulin 10 nM did not have a significant effect on either the AUC of the thapsigargin response in Ca^{2+} -free conditions or on the initial slope of Ca^{2+} influx upon re-admission of external Ca^{2+} (Table 1).

Insulin and ATP induce MAPK phosphorylation in the HTC cell line.

We evaluated the p44/42 MAPK phosphorylation in response to insulin and ATP, since it has not been directly examined previously in HTC cells. HTC cells were treated with increasing concentration of insulin or with 100 μM of ATP for 5 min. The cells were then lysed and analyzed for phosphorylated p44/42 MAPK as described in the Materials and Methods section. HTC cells were found to express predominantly the p44 kDa protein (result not illustrated). As shown in figure 3, insulin led to a dose-dependent increase in p44/42 MAPK phosphorylation. A detectable increase in p44/42 MAPK phosphorylation was induced by as little as 0.1 nM insulin and the maximum response

occurred at concentration of 10 nM, as seen for several other insulin-dependent actions in cultured rat hepatocytes^{24;25}. In comparison, the G-coupled P_{2U} receptor agonist ATP (100 μ M) was found to induce a phosphorylation of p44/42 MAPK that was twice as important as that induced by 10 nM insulin (figure 3).

Effect of Ca²⁺ chelation on insulin- and ATP-induced MAPK phosphorylation.

As in several other cell types, Ca²⁺ ions have been reported to be an important component of both tyrosine kinase and Gq-coupled receptor stimulation of p44/42 MAPK activity in hepatocytes^{2;26}. We thus investigated the role of extracellular Ca²⁺ in insulin- and ATP-induced p44/42 MAPK phosphorylation in these cells. For this purpose, we pre-incubated the cells in the presence of 4 mM EGTA for 15 min before addition of the hormones. As previously demonstrated, this protocol allows the maintenance of a proper mobilization of internal Ca²⁺ from internal pools by G_q-coupled receptor agonists and does not affect insulin binding to its receptor in rat hepatocytes². As shown in figure 4, EGTA pre-treatment significantly diminished both the insulin- and ATP-induced p44/42 MAPK phosphorylation, indicating that an influx of Ca²⁺ is required for the full expression of insulin- and ATP-mediated responses. The stimulation of p44/42 MAPK phosphorylation by insulin and ATP was reduced to a similar extent by external Ca²⁺ chelation ; that is, by approximately 34% and 37% respectively. Control experiments ascertained that pre-treatment of cells with EGTA for 15 min did not significantly alter basal MAPK phosphorylation (results not shown).

Interaction between insulin and ATP at the level of MAPK phosphorylation in

HTC cells.

We next verified the effect of insulin on ATP-induced MAPK phosphorylation. We used a protocol where insulin at different concentrations was administered to HTC cells 1 min prior to and throughout the subsequent 5 min administration of ATP 100 μ M. As figure 5 illustrates, such co-administration of insulin, even at a dose as low as 0.1 nM, significantly decreased the response to ATP. This decrease amounted to approximately 25% of the control ATP response and was similar with all doses of insulin tested. Finally, when insulin and ATP were co-administered in HTC cells which had been pretreated for 15 minutes with EGTA, MAPK phosphorylation was similar to experiments without the Ca^{2+} chelator (results not illustrated).

DISCUSSION

Our laboratory has previously observed that insulin can trigger Ca^{2+} influx into isolated rat hepatocyte couplets and that this effect is important for the full expression of the signaling pathway to MAPK activation². Indeed, both Ca^{2+} influx and MAPK activity were sensitive to Ca^{2+} -channel blockers nickel and gadolinium ions but not to verapamil. Surprisingly, this pharmacological profile is similar to that found for so-called «capacitative» Ca^{2+} influx pathways induced in hepatocytes by mobilization of internal Ca^{2+} stores with G_q -coupled receptor agonists or with thapsigargin, an inhibitor of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase²⁷. The molecular entities responsible for this

capacitative Ca^{2+} influx in liver parenchymal cells are still unknown. However, non-selective cation channels (NSCC) described by Lidofsky and collaborators on rat hepatocytes and HTC cells are activated in response to G_q -coupled agonists¹⁷. These NSCCs were subsequently shown to be sensitive to nickel and SKF96365 but not to verapamil¹⁸; properties that make these channels likely candidates for store depletion-induced Ca^{2+} influx pathways²⁷. Recent studies in our laboratory have demonstrated that insulin triggers inward currents in HTC cells principally by increasing a non-selective cation conductance and that it induces a Ca^{2+} influx with pharmacological properties similar to NSCC¹¹. Together with our previous studies in primary rat hepatocytes, our results thus suggest that insulin activate NSCC in liver cells. However, the thought that insulin may activate Ca^{2+} entry pathways similar to G-coupled receptor agonists is puzzling since insulin is known to antagonize the response of primary rat hepatocytes to the latter^{14;15}. Hence, we studied the interaction of insulin with ATP at the level of membrane potential, cytosolic Ca^{2+} and MAPK, a downstream element of both tyrosine kinase-linked and G_q -coupled receptors. We chose ATP because it is a purinergic P_{2U} agonist previously shown to increase cytosolic Ca^{2+} and to activate NSCC in HTC cells⁶ while being as potent a catabolic hormone as α -adrenergic agonists in both rat and human hepatocytes^{7;9}.

Insulin alone was found to slightly depolarize HTC cells and to trigger a small inward non-selective cation current in these cells in previous and parallel studies¹¹. Despite this fact, in the present studies, the peptide hormone decreased the frequency of appearance as well as the amplitude of the initial ATP-induced rapid depolarization. This initial part

of the triphasic response of membrane potential to P_{2U} purinergic agonists was clearly shown by Fitz and Sostman to represent NSCC activation¹². Hence, our data suggests that insulin may inhibit NSCC activation by G_q-coupled purinergic agonists. Moreover, when added between two consecutive exogenous ATP administrations, insulin significantly diminished the compound Ca²⁺ response to the second addition of ATP. Insulin thus antagonized the response to a G_q-coupled receptor agonist in HTC cells, as expected from its physiological role¹⁴ and as previously observed in primary rat hepatocytes¹⁵.

Our results indicate that the modulation of the ATP-induced Ca²⁺ response by insulin was due to an antagonism of Ca²⁺ influx rather than an effect on G_q-coupled signaling to internal stores. Indeed, in Ca²⁺-free bathing conditions, insulin did not modify the extent of internal Ca²⁺ mobilization by exogenous ATP. However, upon subsequent re-admission of external Ca²⁺, insulin did inhibit the increase in the initial rate of Ca²⁺ influx caused by internal store mobilization with the purinergic agonist. This is consistent with recent work showing that inositol-phosphoglycan, a putative mediator of insulin action, inhibits α -adrenergic- and vasopressin-induced Ca²⁺ oscillations in rat hepatocytes by reducing the sustained Ca²⁺ influx²⁸.

We observed a similar antagonism by insulin of the ATP response at the level of MAPK activation, a downstream signaling event involved in multiple pathways, such as those activated by both tyrosine kinase-linked and G_q-coupled receptor agonists. In rat hepatocytes, the MAPK pathway has already been studied in response to insulin^{1;2;29}

and G_q-coupled receptor agonists²⁶, respectively. It must be noted, however, that our study is the first to show the activation of MAPK in response to insulin and ATP in the HTC hepatoma cell line. MAPK activation was assessed by phosphorylation on both tyrosine and threonine residues^{30;31} with commercially-available specific antibodies. Both insulin and ATP increased the dual phosphorylation of p44/42 MAPK in HTC cells when administered alone. The activation of MAPK induced by insulin was dose-dependent, but 100 μM ATP was found to be roughly twice as potent as 10 nM insulin. On the other hand, as for membrane potential and Ca²⁺ responses, insulin significantly inhibited the ATP-induced activation of MAPK when the peptide hormone was added prior to and throughout the subsequent administration of the nucleotide.

Furthermore, our data clearly implicate an influx of external Ca²⁺ in the action of both insulin and ATP on MAPK phosphorylation in HTC cells. Indeed, removal of free Ca²⁺ from the incubation medium inhibited in part, but to a similar extent, the activation of MAPK by both the tyrosine kinase-linked and the G_q-coupled receptor agonists. This is consistent with our previous studies performed in freshly isolated rat hepatocytes showing that MAPK activity in these cells can be stimulated by Ca²⁺-dependent pathways with both insulin² and G_q-coupled receptor agonists²⁶.

A discrepancy thus appears between the previously reported direct effects of insulin to depolarize liver cells, to increase cytosolic Ca²⁺ and to stimulate MAPK activity² and its antagonism of the same parameters when co-administered with ATP in the present studies. Several hypotheses can account for this apparent discrepancy. For instance, it is

possible that the insulin receptor may act on different NSCC than those activated by G_q -coupled receptor agonists. Indeed, NSCC of 16 and 28 pS have been observed in liver cells¹⁷ but the contribution of each of these to G_q -coupled agonist- or store depletion-induced Ca^{2+} influx has not been ascertained. It is thus conceivable that insulin stimulate one channel type to induce the observed Ca^{2+} /cation influx while inhibiting another type that is more important for Ca^{2+} /cation entry pathways induced by G_q -coupled agonists. Detailed electrophysiological studies will be required to address this possibility.

Alternatively, insulin may mediate its direct and interactive effects through different branches of its signaling pathways. Indeed, the insulin receptor is known to stimulate multiple signal transduction pathways including several isoforms of PKC in hepatocytes^{32;33}. On the other hand, NSCC present on HTC cells have been shown to be inhibited by the conventional α -isoform of PKC as part of a putative negative feedback loop after activation of G_q -coupled P_{2U} receptor⁶. Hence, an attractive hypothesis is that insulin may amplify the negative feedback mechanism mediated by PKC. This would explain the inhibition by insulin of the rapid depolarization and Ca^{2+} influx induced by ATP, both of which were previously related to NSCC activation by other laboratories^{12;18}. The reduced Ca^{2+} influx could in turn explain the partial but significant decrease in MAPK activity when insulin and ATP are added together as opposed to when ATP is administered alone. Indeed, we found that the activation of MAPK by both agonists was partly dependent on Ca^{2+} influx as seen previously in primary rat hepatocytes^{2;26}. Finally, when insulin and ATP were co-administered in EGTA-pretreated HTC cells, the Ca^{2+} -chelator did not further affect the inhibition by insulin of

ATP-induced MAPK activation. Thus, Ca^{2+} influx appears to play an important role for the modulation of ATP-induced MAPK activation by insulin.

On the other hand, the hypothesis of enhanced PKC negative feedback in insulin antagonism of ATP implicates that insulin alone could activate NSCC-related HTC cell currents and Ca^{2+} influx by a distinct signaling pathway that remains to be determined. However, it must be noted that insulin has been shown to activate a non-selective cationic current in CHO cells transfected with human insulin receptor and that this was mediated by a pertussis toxin-sensitive G-protein³⁴. Similarly, external Ca^{2+} was found to be necessary for the insulin stimulation of phosphodiesterase activity in hepatocytes³⁵, an action thought to be mediated by $\text{G}\alpha_i$ proteins³⁶. Indeed, $\text{G}\alpha_i$ proteins have been shown to be crucial for insulin action³⁷. Further experiments will be necessary to assess the role of G-proteins in insulin's action on hepatocellular Ca^{2+} influx pathways.

In conclusion, our results clearly demonstrate that insulin antagonizes the action of the P2U purinergic agonist ATP on Ca^{2+} /cation influx into HTC cells. Our study strongly suggests that the site of interaction between insulin- and ATP-induced signaling cascades resides at the membrane, probably at the level of NSCC. Finally this antagonism by insulin of ATP-induced Ca^{2+} influx plays a major role in the modulation of MAPK activity.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: **Effect of 10 nM insulin on membrane potential changes induced by ATP in HTC cells.** In control experiments (●), membrane potential changes were measured in HTC cells which were perfused with 100 μ M ATP for a period of 5 min followed by 5 min of washout. In experiments with insulin (▽), cells were treated with the peptide for 5 min prior to and during the subsequent 5 min challenge with ATP. The data represent the average of 6 separate experiments with an initial membrane potential (V_m) of -41.8 ± 5.0 mV for insulin-pretreated cells and of 24 individual cells which had an initial V_m of -46.3 ± 2.6 mV for controls.

Figure 2 : **Effect of insulin on ATP-induced Ca^{2+} response in HTC cells.** A : Representative trace of the cytosolic Ca^{2+} response to two 2-min pulses of 100 μ M ATP administered at an interval of 5 min. The compound response to the second ATP pulse amounted to $79 \pm 6\%$ of the first as measured by the ratio of the respective areas under the cytosolic Ca^{2+} -versus-time curves (AUC2/AUC1, n=26). B : in this representative trace, 10 nM insulin was introduced 1 min prior to and during the second 2-min challenge with ATP. Insulin significantly decreased the second ATP response to $56 \pm 3\%$ of the first one (AUC2/AUC1, n=42).

Figure 3 : **Insulin induces concentration-dependent p44/42 MAPK phosphorylation.** HTC cells were incubated in MEM containing 0.5% serum for 16-20 h and treated with the indicated concentrations of insulin or 100 μ M ATP for 5 min. Cells were lysed and cell lysates were processed as described under Materials and Methods for immunoblotting with anti-p44/42 MAPK antibody to determine the phosphorylation state of p44/42 MAPK. The phosphorylation of p44/42 MAPK bands were quantified by using NIH imager. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3). Statistical significance is indicated for differences between control and agonist (*) and between ATP and insulin (**)($p < 0.001$).

Figure 4 : **Effect of EGTA on Insulin and ATP-induced p44/42 MAPK phosphorylation.** HTC cells were preincubated in MEM medium containing 4 mM EGTA for 15min. before insulin and ATP were added for 5 min. Cells were analyzed for p44/42 MAPK phosphorylation as described in the legend of figure 3. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3). Statistical significance is indicated for differences between agonist and agonist + EGTA (for insulin * $p < 0.005$; for ATP ** $p < 0.05$).

Figure 5 : **Effect of insulin on ATP-induced MAPK phosphorylation in HTC cells.** HTC cells were stimulated with insulin 10 nM for 1 min prior and throughout the subsequent administration of ATP 100 μ M for 5 min. Cells were analyzed as described in the legend of figure 3. Results are

expressed as the mean \pm SEM (n=3). Statistical significance is indicated for differences between ATP and insulin (*p<0.0001)

ACKNOWLEDGMENTS

These studies were supported by the Canadian Diabetes Association, by the Medical Research of Canada, by the Canadian Liver Foundation and by the Fonds pour la Formation des chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) du Québec. P.H. is a chercheur-boursier (research scholar) of the Fonds de la recherche en santé du Québec. K.B. was supported by a graduate studentship from the Groupe de recherche en transport membranaire made possible by an infrastructure grant from the FCAR and from the Université de Montréal. We wish to express our gratitude to Dr. A. Srivastava for providing access to his laboratory and for precious counseling. We thank Ms. E. Peres for her excellent graphic skills.

REFERENCES

- 1 Agius L, Peak M, Beresford G, Al-Habori M, Thomas TH. The role of ion content and cell volume in insulin action. *Biochem.Soc.Trans.* 1994;**22**:516-522.
- 2 Benzeroual K, Van de Werve G, Meloche S, Mathé L, Romanelli A, et al. Insulin induces Ca²⁺ influx into isolated rat hepatocytes couplets. *Am.J.Physiol.* 1997;**272**:G1425-G1432

- 3 Benzeroual K, Pandey S, Srivastava A, Van de Werve G, Haddad P. Implication of calcium in the stimulation of phosphatidylinositol-3-kinase activity by insulin in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1997;**26**:481A(Abstract)
- 4 Blackmore PF, Exton JH. Studies on the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminum fluoride and glucagon: modulation by cAMP and phorbol myristate acetate. *J.Biol.Chem.* 1986;**261**:11056-11063.
- 5 Bear C, Li C. Calcium-permeable channels in rat hepatoma cells are activated by extracellular nucleotides. *Am.J.Physiol.* 1991;**261**:C1018-C1024
- 6 Fitz JG, Sostman AH, Middleton JP. Regulation of cation channels in liver cells by intracellular calcium and protein kinase C. *Am.J.Physiol.* 1994;**266**:G677-G684
- 7 Keppens S, Vandekerchove A, De Wulf H. Extracellular ATP and UTP exert similar effects on rat isolated hepatocytes. *Br.J.Pharmacol.* 1992;**105**:475-479.
- 8 O'Connor SE, Dainty IA, Leff P. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol.Sci.* 1991;**12**:137-141.
- 9 Keppens S, Vandekerckhove A, Moshage H, Yap SH, Aerts R, et al. Regulation of glycogen phosphorylase activity in isolated human hepatocytes. *Hepatology* 1993;**17**:610-614.
- 10 Wondergem R. Insulin depolarization of rat hepatocytes in primary monolayer

- culture. *Am.J.Physiol.* 1983;**244**:C17-C23
- 11 Mathé L, Vallerand D, Haddad P. Insulin induces calcium influx into HTC cells through a non-selective cationic conductive pathway. *Hepatology* 1997;**26**:263A(Abstract)
 - 12 Fitz JG, Sostman AH. Nucleotide receptors activate cation, potassium and chloride currents in a liver cell line. *Am.J.Physiol.* 1994;**266**:G544-G553
 - 13 Friedmann N, Dambach G. Antagonistic effect of insulin on glucacagon-evoked hypolarisation:A correlation between changes in membrane potential and gluconeogenesis. *Biochim.Biophys.Acta* 1980;**596**:180-185.
 - 14 Van de Werve G, Hue L, Hers H-G. Hormonal and ionic control of the glycogenolytic cascade in rat liver. *Biochem.J.* 1977;**162**:135-142.
 - 15 Dehaye J-P, Hughes BP, Blackmore PF, Exton JH. Insulin inhibition of alpha-adrenergic actions in liver. *Biochem.J.* 1981;**194**:949-956.
 - 16 Somogyi R, Zhao M, Stucki JW. Modulation of cytosolic-[Ca²⁺] oscillations in hepatocytes results from cross-talk among second messengers. The synergism between the α_1 -adrenergic response, glucagon and cyclic AMP, and their antagonism by insulin and diacylglycerol manifest themselves in the control of the cytosolic-[Ca²⁺] oscillations. *Biochem.J.* 1992;**286**:869-877.
 - 17 Lidofsky SD, Xie MH, Sostman A, Scharschmidt BF, Fitz JG. Vasopressin

- increases cytosolic sodium concentration in hepatocytes and activates calcium influx through cation-selective channels. *J.Biol.Chem.* 1993;**268**:14632-14636.
- 18 Lidofsky SD. Properties of hepatocellular cation-selective channels suggest a prominent role in receptor-mediated calcium entry. *Hepatology* 1995;**22**:306A(Abstract)
- 19 Heaton JH, rett NL, Alvarez JM, Gelehrter TD, Romanus JA, et al. Insulin regulation of insulin-like growth factor action in rat hepatoma cells. *J.Biol.Chem.* 1984;**259**:2396-2402.
- 20 Sung CK, Sanchez-Margalet V, Goldfine ID. Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor, p62, and GTPase-activating protein. *J.Biol.Chem.* 1994;**269**:12503-12507.
- 21 Wetsel WC, Kahn WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, et al. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J.Cell Biol.* 1992;**117**:121-133.
- 22 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sackmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* 1981;**391**:85-100.
- 23 Fernando KC, Barritt GJ. Characterisation of the inhibition of the hepatocyte receptor-activated Ca^{2+} inflow system by gadolinium and SK&F 96365.

Biochim.Biophys.Acta 1994;**1222**:383-389.

- 24 Iynedjian PB, Jotterand D, Nospikel T, Asfari M, Pilot PR. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J.Biol.Chem.* 1989;**264**:21824-21829.
- 25 Morin O, Fehlmann M, Freychet P. Binding and action of insulin and glucagon in monolayer cultures and fresh suspensions of rat hepatocytes. *Mol.Cell.Endocrinol.* 1982;**25**:339-352.
- 26 Romanelli A, Van de Werve G. Activation of mitogen-activated protein kinase in freshly isolated rat hepatocytes both by a calcium- and protein kinase C-dependent pathway. *Metabolism* 1997;**46**:548-555.
- 27 Fernando KC, Barritt GJ. Characterisation of the divalent cation channels of the hepatocyte plasma membrane receptor-activated Ca^{2+} inflow system using lanthanide ions. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;**1268**:97-106.
- 28 Sanchez-Bueno A, Greenwood MR, Varela-Nieto I, Marrero I, Gil B, et al. Inositol-phosphoglycan inhibits calcium oscillations in hepatocytes by reducing calcium entry. *Cell Calcium* 1997;**21**:125-133.
- 29 Tobe K, Kadowaki T, Hara K, Gotoh Y, Kosako H, et al. Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J.Biol.Chem.* 1992;**267**:21089-21097.

- 30 Ray LB, Sturgill TW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1988;**85**:3753-3757.
- 31 Keyse SM. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;**1265**:152-160.
- 32 Croquet F, Bréthier A, Gil S, Davy J, Féger J. Five isoenzymes of protein kinase C are expressed in normal and STZ-diabetic rat hepatocytes: effect of phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochim.Biophys.Acta* 1996;**1315**:163-168.
- 33 Tang EY, Parker PJ, Beattie J, Houslay MD. Diabetes induces selective alterations in the expression of protein kinase C isoforms in hepatocytes. *FEBS Lett.* 1993;**326** :117-123.
- 34 Nie L, Kanzaki M, Shibata H, Kojima I. Activation of calcium-permeable cation channel by insulin in Chinese Hamster Ovary cells expressing human insulin receptor. *Endocrinology* 1998;**139**:179-188.
- 35 Irvine F, Wallace AV, Sarawak SR, Houslay MD. Extracellular calcium modulates insulin's action on enzymes controlling cyclic AMP metabolism in intact hepatocytes. *Biochem.J.* 1993;**293**:249-253.
- 36 Houslay MD, Pyne NJ, O'Brien RM, Siddle K, Strassheim D, et al. Guanine nucleotide regulatory proteins in insulin's actions and in diabetes. *Biochem.Soc.Trans.* 1989;**17**:627-629.

- 37 Moxham CM, Malbon CC. Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit $G_{i\alpha 2}$. *Nature* 1996;**379**:840-844.

Table 1: Direct and interactive effects of 10 nM insulin on the initial Ca^{2+} influx rate observed upon re-admission of external Ca^{2+} after a period of Ca^{2+} -free perfusion.

	Insulin (10 nM)	
	without	with
Control	1.0 (n=36)	1.32 ± 0.32 (n=22)*
ATP (100 μM)	1.99 ± 0.54 (n=16)*	1.05 ± 0.38 (n=16)
Tg (0.5 μM)	1.92 ± 0.29 (n=10)*	1.76 ± 0.32 (n=10)*

Ratios reported represent the initial rate of Ca^{2+} influx (nM/sec, measured over the initial 15 sec of the cytosolic Ca^{2+} -versus-time curve upon re-admission of external Ca^{2+} after a 15 min period of Ca^{2+} -free perfusion) observed for individual experiments divided by the average value observed in daily controls (control set to equal 1.00). Direct effects of insulin (10 nM) or ATP (100 μM) were observed when added 2 min prior to external Ca^{2+} re-admission. Thapsigargin (Tg 0.5 μM) was present for 5 min before the return to normal Ca^{2+} bathing conditions. Interactive effects of insulin on Ca^{2+} influx triggered by internal store depletion was studied by introducing insulin 1 min prior to and throughout the subsequent ATP or Tg administration. *Significantly different from control value by paired t-test; $p < 0.01$.

Figure 1

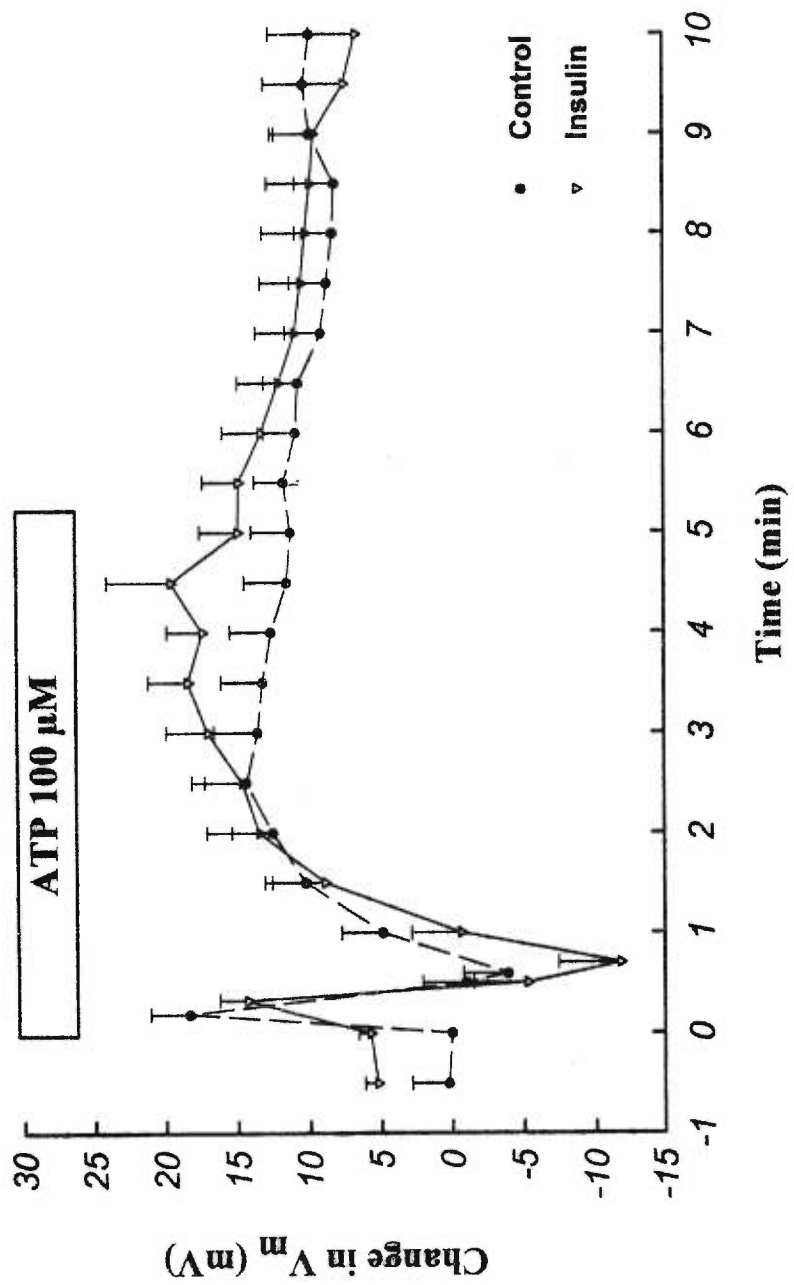


Figure 2

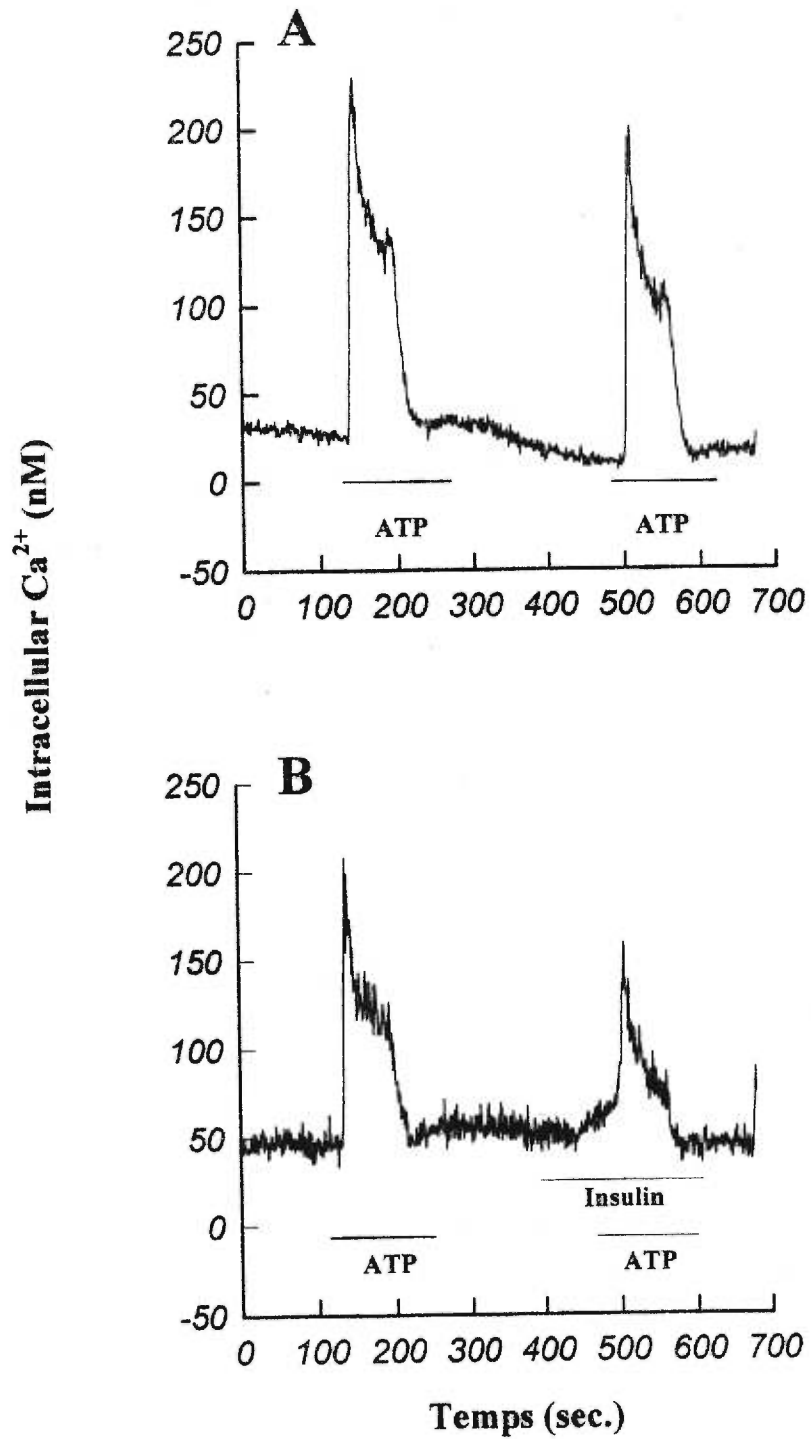


Figure 3

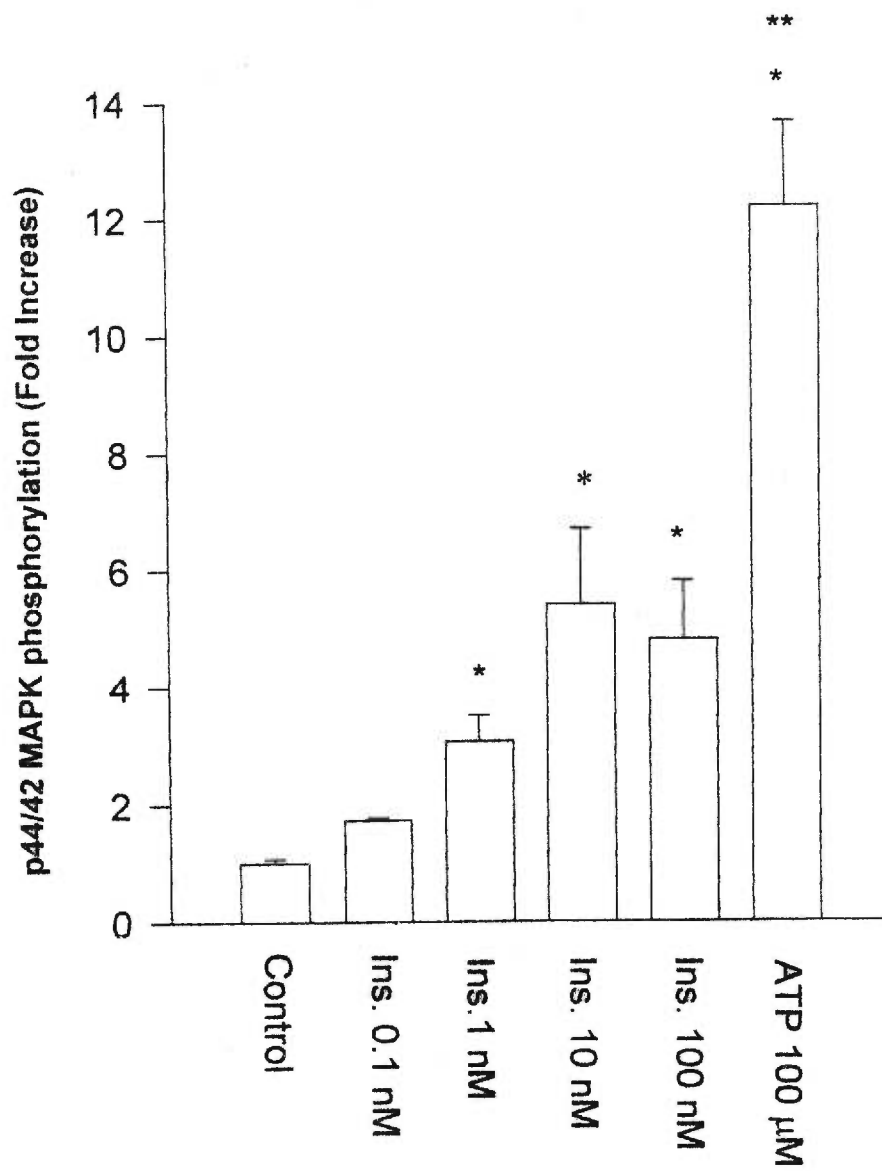


Figure 4

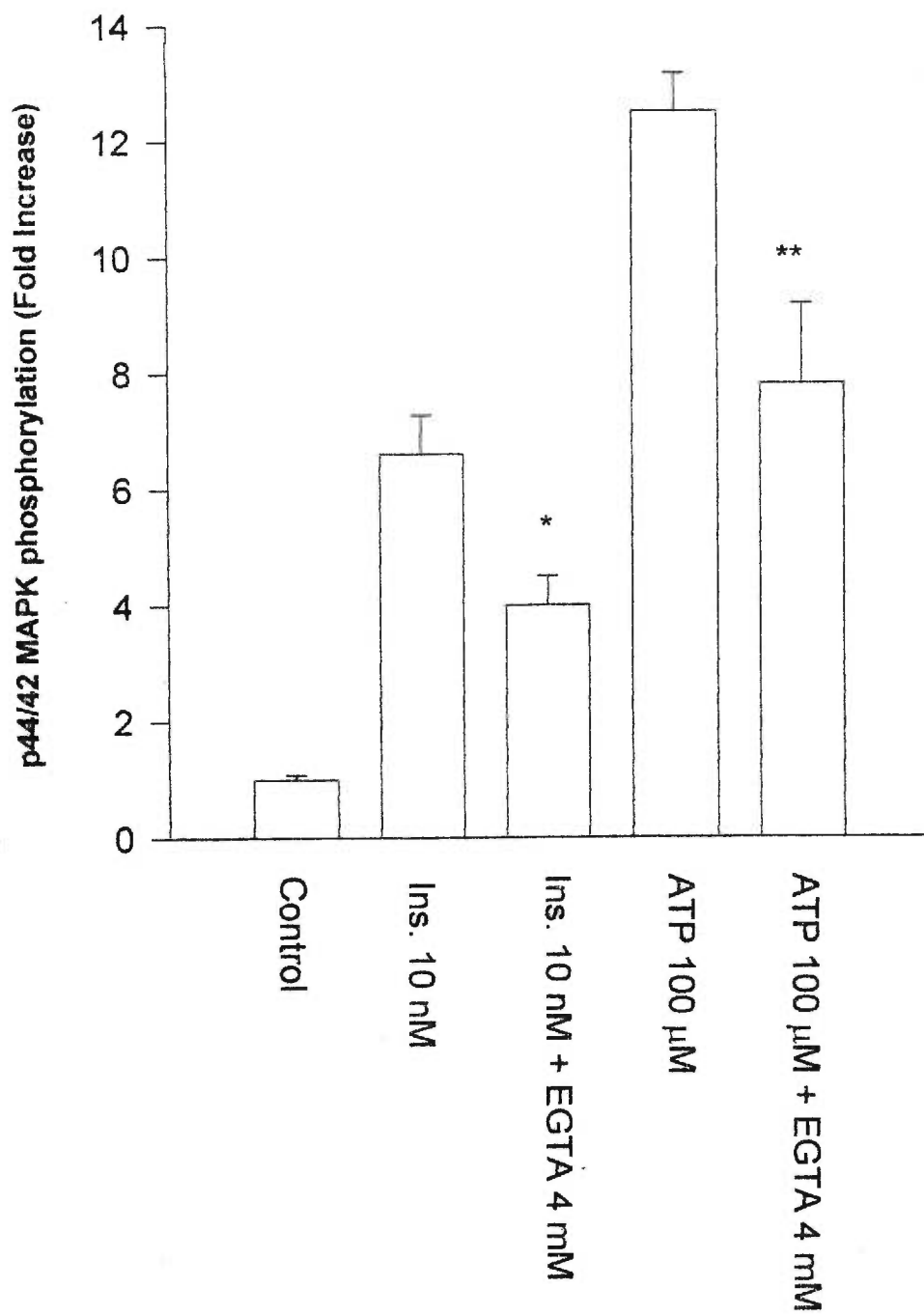
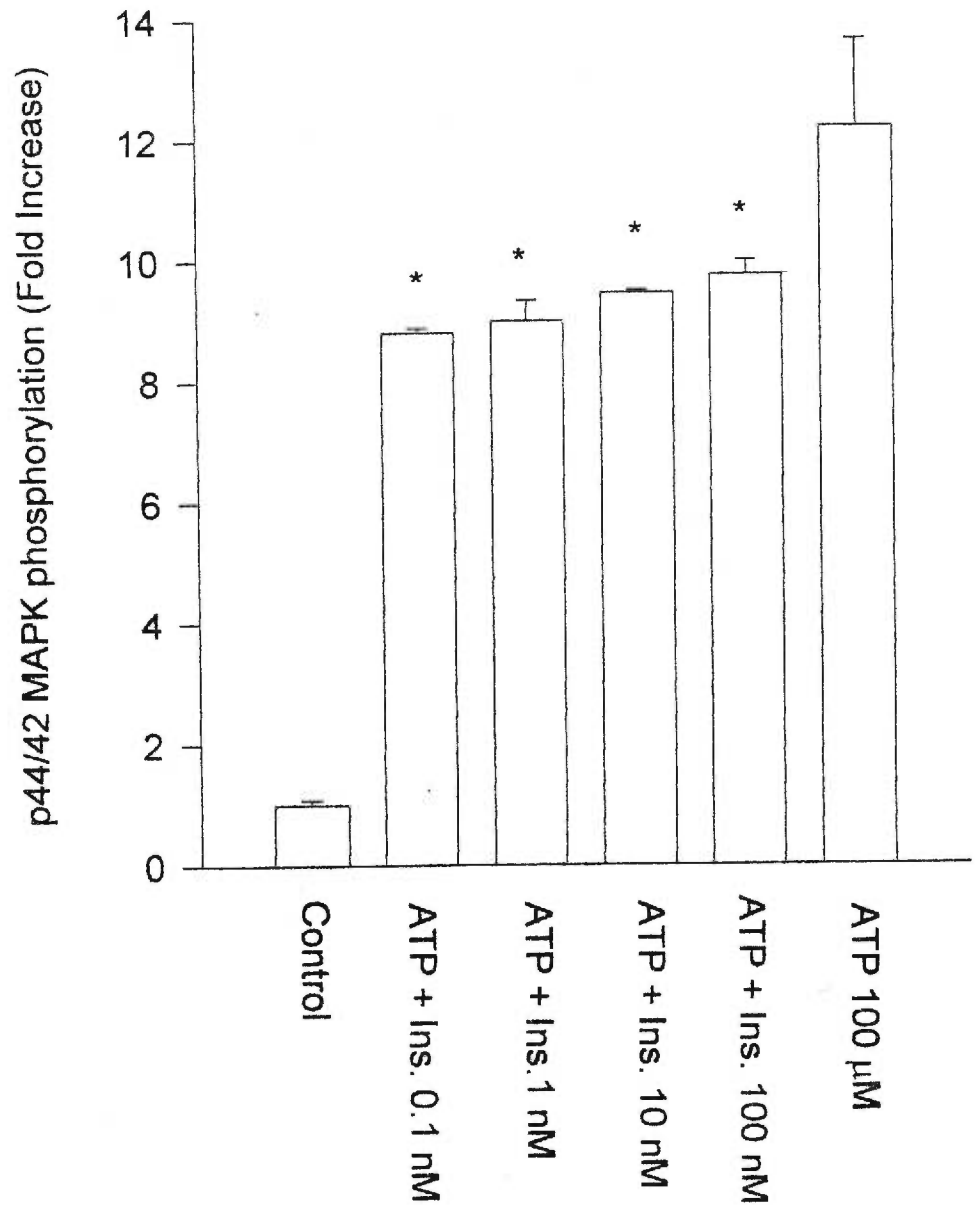


Figure 5



VI-DISCUSSION

5.1- EFFET DE L'INSULINE SUR LE CALCIUM HEPATOCELLULAIRE

L'insuline est une hormone anabolique produite par le pancréas suite à une élévation du taux sérique de glucose et d'acides aminés. Elle agit sur le foie, le muscle et le tissu adipeux pour promouvoir l'emmagasinage et l'utilisation de glucose. Plusieurs évidences supportent un rôle pour le calcium extracellulaire dans différentes réponses physiologiques de l'insuline entre autres, le transport de glucose et la synthèse des protéines. L'implication du calcium extracellulaire dans le mécanisme d'action de l'insuline au niveau hépatocellulaire n'a pas été clairement étudié. Une étude préalable a montré que l'insuline augmente le calcium cytosolique dans les hépatocytes perméabilisés à la digitonine à l'équilibre (Strunecka, 1985). L'étude présente décrit l'effet direct de l'insuline sur le calcium hépatocellulaire, ainsi que les différentes voies de signalisation qui sont affectées par ce second messenger.

5.1.1- Effet propre de l'insuline sur le calcium hépatocellulaire

Une étude a montré que l'insuline dans certaines conditions particulières amenait plus souvent un ralentissement des oscillations du calcium cytosolique induit par un agent α_1 -adrénergique. Les auteurs proposent que cet effet de l'insuline participe à l'antagonisme métabolique des catécholamines (Somogyi et al., 1992). Voulant étudier plus en détail cette interaction, nous avons mis à jour un effet propre et surprenant de l'insuline chez les doublets d'hépatocytes isolés de rat et mis en culture à court terme. Ainsi, nous avons découvert que l'insuline augmente

la $[Ca^{2+}]_i$ (article 1). Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ se fait de manière dépendante de la dose avec une DE_{50} de 0.5 nM qui est compatible avec la concentration physiologique de l'insuline (Karam, 1995). La réponse calcique à l'insuline est généralement monophasique et transitoire, comparée à celle de la phényléphrine qui est biphasique et soutenue pour toute la durée de l'administration. En effet, la réponse observée avec la phényléphrine est typique d'une réponse aux α_1 -adrénergiques, où le pic représente une mobilisation du calcium des réserves intracellulaires et la deuxième phase plateau représente un influx de calcium qui, selon le modèle d'entrée "capacitatif", est déclenché par la vidange des réserves intracellulaires (Berridge, 1993). Ceci indique que l'insuline et la phényléphrine modulent l'homéostasie du calcium hépatocellulaire par des mécanismes différents. La chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA prévient la réponse calcique à l'insuline, tandis que celle induite par la phényléphrine est réduite à un simple pic transitoire dû à la mobilisation du calcium à partir des réserves intracellulaires sensibles à l' IP_3 . L'absence de la réponse induite par l'insuline n'est pas due à la vidange des réserves intracellulaires de calcium par la phényléphrine. En effet, la perte de la réponse calcique à l'insuline est observée avant ou après que le calcium hépatocellulaire a été mobilisé des réserves intracellulaires par la phényléphrine. De même l'absence de réponse calcique en présence d'EGTA n'est pas liée à un effet de ce chélateur sur la liaison de l'insuline à son récepteur tel que confirmé par des études de déplacement. Nos résultats indiquent donc que l'insuline ne mobilise pas le calcium à partir des réserves intracellulaires mais provoque plutôt un influx de calcium dans les hépatocytes.

Divers facteurs de croissance dont les récepteurs à activité tyrosine kinase comme celui de l'insuline sont couplés à l'isoforme γ de la PLC et mobilisent le calcium en conséquence de la production de phosphoinositides dans le foie. C'est le cas pour le récepteur à l'EGF (Cerpovicz et Ochs, 1992; Tanaka et al., 1992) et à l'HGF (Osada et al., 1992). Cependant, à date il n'y a aucune évidence que le récepteur à l'insuline soit couplé à la PLC γ dans les hépatocytes. En effet, nos résultats montrent clairement que l'effet de l'insuline sur le calcium hépatocellulaire est strictement dépendant de la présence de calcium extracellulaire ce qui n'est pas le cas pour les autres facteurs de croissance. Cette étude supporte le fait que malgré les similarités entre les voies de signalisation de l'insuline et les facteurs de croissance, ces agents exercent des effets distincts à court terme sur le transport membranaire hépatocellulaire. Ceci est en accord avec les études faites au préalable dans notre laboratoire sur l'échangeur Na^+/H^+ dans les hépatocytes isolés de rat, qui montrent que l'insuline et l'EGF modulent de manière distincte l'activité de cet échangeur (Haimovici et al., 1994).

L'effet de l'insuline sur le calcium semble a priori paradoxal puisque l'insuline est une hormone anabolique alors que le calcium joue un rôle dans les effets des hormones cataboliques. Cependant, l'effet décrit ci-haut est compatible avec la récente observation faite par Comte et collaborateurs. (1997). Cette dernière étude montre que la Dext, un agent anti-hyperglycémiant oral qui mime plusieurs effets de l'insuline augmente le calcium hépatocellulaire en même temps qu'il active la phosphorylase qui est une enzyme glycogénolytique. Cependant, cet agent n'augmente pas la production nette de glucose mais plutôt augmente le flux

glycolytique. Cet effet est également semblable à celui que l'insuline exerce in vivo (stimulation de la glycolyse).

5.1.2- Détermination du profil pharmacologique de l'influx de calcium stimulé par l'insuline

Les voies d'entrée du calcium dans les hépatocytes ont été intensivement étudiées. Cependant, il n'y a pas d'évidences pour la présence de canaux calciques dépendants du voltage dans ces cellules (Mauger et claret, 1988) comme c'est d'ailleurs le cas pour la plupart des cellules d'origine épithéliale (Fewtrell, 1993). Récemment, des CCNS de 18 et 28 pS ont été décrits à la surface des cultures primaires d'hépatocytes de rat et sur les cellules HTC (Lidofsky et al., 1993). Ces canaux sont activés par le calcium intracellulaire et inhibés par la PKC (Fitz et al., 1994). Ils sont aussi insensibles au vérapamil mais sont bloqués par le nickel et le SKF96365 (Lidofsky, 1995). Ces propriétés sont similaires à ceux de l'influx de calcium induit par les agonistes des RCPGq et à celui induit par la vidange des réserves intracellulaires dans les cellules hépatiques. En effet, des études ont montré que le nickel, le gadolinium et le SKF96365 peuvent inhiber l'influx de calcium hépatocellulaire induit par les agonistes des RCPGq (Nathanson et al., 1992 ; Fernando et Barritt, 1994a, 1995). Le gadolinium inhibe aussi l'influx de calcium induit par la thapsigargine suite à la vidange des réserves intracellulaires dans les hépatocytes de rat (Fernando et Barritt, 1994b). Ces CCNS présents sur la membrane des hépatocytes et des cellules HTC pourraient être des candidats responsables de l'influx de calcium induit par les agonistes des RCPGq (Lidofsky et al., 1993; Fernando et Barritt, 1995).

Dans cette étude, le profil pharmacologique de l'influx de calcium induit par l'insuline a été déterminé en utilisant comme bloqueurs calciques le vérapamil, le nickel et le gadolinium. Le vérapamil à deux concentrations différentes (20 μM et 200 μM) ne bloque pas la réponse calcique à l'insuline. Nos résultats corroborent ceux d'autres études démontrant que les réponses calciques induites par la vasopressine et par l'angiotensine II ne sont pas affectées par cet inhibiteur de canaux calciques dépendants du voltage (Kass et al., 1990). Cependant, nos observations vont à l'encontre d'autres travaux qui ont démontré un effet inhibiteur avec de fortes doses de vérapamil sur les mouvements de calcium induit par la vasopressine (Striggow et Bohnensack, 1993) et l'EGF (Bilodeau et al., 1995). Cependant, l'action principale du vérapamil est de bloquer les canaux calciques dépendants du voltage que les hépatocytes ne possèdent pas. Par ailleurs, il existe des sites de liaison de faible affinité pour le vérapamil sur ces cellules. Ainsi, la contradiction entre nos observations présentes et celles des autres études est probablement liée à une action non spécifique de cet agent. D'un autre côté, le nickel (bloqueur à large spectre de canaux calciques) et le gadolinium (inhibiteur de canaux cationiques non sélectifs) inhibent fortement l'influx de calcium induit par l'insuline. Ces résultats corroborent ceux récemment décrits par Nie et collaborateurs (1998) qui ont montré que l'insuline augmente le calcium cytosolique dans les cellules CHO-IR en activant un canal perméable au calcium qui est indépendant du voltage et qui est bloqué par le nickel. Des études parallèles faites dans notre laboratoire ont montré que l'insuline augmente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules HTC probablement en activant les CCNS (Mathé et al., 1997). Ensemble donc, les résultats obtenus en présence d'EGTA et de vérapamil, montrent que ce profil pharmacologique est compatible avec l'implication des

CCNS dans l'influx de calcium stimulé par l'insuline dans les cellules hépatiques avec l'absence d'un effet de l'hormone sur les réserves intracellulaires de calcium.

5.1.3- Le rôle de l'influx de calcium dans les voies de signalisation cellulaire de l'insuline

Les études effectuées avec l'insuline nous ont également permis d'évaluer l'importance du signal calcique dans les voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'action de cette hormone et qui jouent un rôle important dans les différentes réponses physiologiques observées avec cette dernière.

a) - La voie MAPK

Le rôle physiologique de l'influx de calcium induit par l'insuline dans les hépatocytes reste inconnu. Des études ont montré que le calcium extracellulaire est important pour l'effet de l'insuline sur le métabolisme de l'AMPc (Irvine et al., 1993) et la synthèse des protéines (Rogers et al., 1991) dans les hépatocytes de rat. Cependant, les mécanismes impliqués n'ont pas encore été élucidés. Par ailleurs, des évidences ont déjà montré que l'activation de la MAPK peut se faire selon un mécanisme dépendant du calcium dans certains types cellulaires (Chao et al., 1992; Sadoshima et al., 1995; Rosen et Greenberg, 1996) incluant les hépatocytes (Romanelli et van de Werve, 1997). Dans cette étude, nous avons étudié l'implication des mouvements calciques induits par l'insuline sur la stimulation de l'activité MAPK. Nous avons trouvé que les conditions expérimentales qui interfèrent avec l'influx de calcium induit par l'insuline (EGTA, nickel et gadolinium) inhibent fortement l'activité de la MAPK induite

par l'hormone. Par contre le vérapamil, qui était incapable de bloquer la réponse calcique induite par l'insuline, est également incapable de prévenir la stimulation de l'activité MAPK par cette dernière. Nos résultats sont en accord avec ceux décrits par Romanelli et van de Werve (1997) qui ont montré que l'activité MAPK hépatocellulaire peut être stimulée non seulement par les agonistes mobilisateurs de calcium mais aussi par la thapsigargine et l'ionomycine (ionophore à calcium). De plus, la stimulation de l'activité MAPK par ces hormones et ces agents pharmacologiques était inhibée par la chélation du calcium extracellulaire grâce à l'EGTA. Ceci suggère que l'influx de calcium est important pour la stimulation de l'activité MAPK par l'insuline.

Dans le foie, l'insuline active clairement la MAPK (Tobe et al., 1992; Agius et al., 1994). Cependant, le rôle de cette kinase dans les effets métaboliques à court terme de l'insuline reste à élucider. Dans le muscle squelettique, il est postulé que l'insuline serait impliquée dans la stimulation de la synthèse de glycogène en réponse à l'insuline par activation de la PP1G via la p90RSK (Cohen, 1993). Cependant, aucune évidence pour un tel mécanisme n'a été présentée dans le foie. Récemment, Carlsen et ses collaborateurs. (1997) en utilisant le PDO98059, un inhibiteur de la MEK, ont démontré que la MAPK est impliquée dans la synthèse de glycogène au niveau hépatocellulaire. D'autres ont montré que dans les cellules CHO-IR l'insuline active un canal perméable au calcium. Quand ce canal est bloqué par le nickel, l'effet de l'insuline sur la synthèse de l'ADN, une conséquence de l'activation de la MAPK par les facteurs de croissance, est aussi bloqué (Seger et Krebs, 1995).

b)- La voie PI3-K

Etant donné l'importance de la voie PI3-K dans la cascade de signalisation de l'insuline, nous avons évalué le rôle du calcium sur cette seconde voie majeure intervenant dans divers effets physiologiques de l'insuline. L'étude décrite dans l'article 2 montre que l'insuline stimule l'activité PI3-K de manière dépendante du temps d'incubation et de la dose dans les hépatocytes de rat isolés et mis en culture à court terme. Nos résultats montrent aussi que la préincubation des hépatocytes en présence d'EGTA, de nickel et de gadolinium, bloquent fortement la stimulation de l'activité PI3-K par l'insuline. Par contre le vérapamil est sans effet sur l'activité de cette enzyme. Ce profil pharmacologique est similaire à celui obtenu précédemment pour la stimulation de l'activité MAPK. Ceci suggère que l'influx de calcium joue aussi un rôle important dans l'activation de la PI3-K. Ceci est en accord avec les données montrant que le calcium peut moduler directement l'activité PI3-K (Singh et al., 1995). Par ailleurs, il est connu que l'insuline active la calmoduline (Sacks et al., 1992). Récemment, il a été rapporté que la calmoduline peut stimuler l'activité PI3-K de manière dépendante du calcium (Joyal et al., 1997). Cependant, les mécanismes précis de cette activation ne sont pas connus. D'autres ont montré que l'IGF-1 module les canaux calciques neuronaux de manière dépendante de la PI3-K (Lesley et al., 1997). Les canaux calciques pourraient donc être les cibles des RTK. En fait, des études de patch clamp en mode whole-cell, faites dans notre laboratoire ont montré que l'insuline augmente le calcium cytosolique probablement en ouvrant les CCNS (Mathé et al., 1997).

La transmission du signal de l'insuline semble se faire selon un réseau de voies distinctes et interconnectées. Dans ce contexte, on doit noter que plusieurs études ont démontré l'interaction de la voie PI3-K avec la voie MAPK. Il a été rapporté que la PI3-K peut former un complexe avec Ras (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Par ailleurs, d'autres ont montré que la wortmannine inhibe la stimulation de l'activité Erk1 par l'insuline dans les hépatocytes primaires, suggérant que l'activité PI3-K est en amont de celle de la MAPK dans ces cellules (Christian et Posner, 1997). Récemment, une autre étude a montré que les activités PI3-K et MAPK sont importantes pour stimuler la synthèse de glycogène par l'insuline dans les hépatocytes (Carlsen et al., 1997). Prises ensemble, ces données suggèrent que l'influx de calcium induit par l'insuline au niveau hépatique peut stimuler l'activité PI3-K et subséquemment activer la cascade MAPK. Même si d'autres expériences sont requises pour vérifier cette possibilité, il est fort probable que le calcium module les voies de signalisation de l'insuline à différents niveaux.

c)- Effet du calcium sur la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 et de la sous-unité β du récepteur à l'insuline

Etant donné que l'activité PI3-K est principalement stimulée par l'IRS-1 phosphorylé sur les tyrosines en réponse à l'insuline, nous avons évalué l'effet de l'influx calcique sur la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1. Nos résultats montrent que la phosphorylation des tyrosines de la sous-unité β du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 par l'insuline n'est pas affectée par la chélation du calcium par l'EGTA, ni par les bloqueurs de canaux calciques dont le nickel, le gadolinium et le vérapamil. Ceci suggère que

l'influx de calcium intervient dans la cascade de signalisation en aval de l'IRS-1. Ces résultats corroborent ceux décrits par Nie et al. (1998) qui ont rapporté que dans des conditions où la phosphorylation de l'IRS-1 est diminuée, l'insuline est toujours capable d'activer un canal perméable au calcium. Ceci indique que la phosphorylation d'IRS-1 n'est pas un prérequis pour l'activation du canal. Nos résultats suggèrent donc, que l'influx de calcium induit par l'insuline est important pour coupler le récepteur de l'insuline à l'activité MAPK et PI3-K. D'autres expériences sont tout de même nécessaires pour interpréter et expliquer les voies de signalisation qui lient le récepteur de l'insuline aux canaux cationiques membranaires hépatocellulaire.

5.2- INTERACTION ENTRE L'INSULINE ET LES AGONISTES MOBILISATEURS DE CALCIUM

Une bonne partie des effets de l'insuline consiste également à antagoniser les effets des hormones cataboliques tels que le glucagon et la phényléphrine. Cependant, les mécanismes de cette interaction ne sont pas clairs. Comme on l'a vu plus haut, l'insuline augmente le calcium intracellulaire en provoquant un influx de calcium dans les doublets d'hépatocytes de rat. Cette action est importante pour coupler le récepteur tyrosine kinase de l'insuline à l'activité MAPK et PI3-K. D'autres études de notre laboratoire ont aussi démontré au préalable que l'insuline et l'ATP augmentent la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules HTC, probablement en activant des CCNS (Mathé et al., 1997). De plus, il est connu que les agent mobilisateurs de calcium tels que la phényléphrine et l'ATP exercent leurs actions cataboliques dans les cellules hépatiques en partie en augmentant le

calcium intracellulaire. Dans l'article 3, nous avons étudié l'effet du calcium sur l'interaction entre l'insuline et l'ATP dans les cellules HTC à différents niveaux.

5.2.1- Interaction au niveau membranaire

Des études de patch clamp en mode whole-cell, ont montré que l'insuline diminue la fréquence d'apparition ainsi que l'amplitude de la dépolarisation initiale induite par l'ATP. Cette phase initiale de la réponse triphasique du potentiel membranaire en réponse aux agonistes purinergiques, comme l'ATP, représente l'entrée du calcium par les CCNS (Fitz et Sostman, 1994). L'insuline antagonise donc la réponse initiale des RCPGq dans les cellules HTC. Ceci est compatible avec son action physiologique d'antagoniser les réponses α_1 -adrénergiques au niveau hépatique (van de Werve et al., 1977; Dehaye et al., 1981; Somogyi et al., 1992). De même, dans notre étude, quand l'insuline est administrée 1 minute avant l'administration de l'ATP dans les conditions physiologiques, l'insuline diminue significativement la réponse calcique induite par l'ATP. De plus, nos résultats montrent que ceci est dû à un antagonisme de l'influx de calcium plutôt qu'un effet sur la mobilisation du calcium à partir des réserves intracellulaires en réponse aux RCPGq. En effet, dans des conditions où le calcium est enlevé du milieu extracellulaire l'insuline ne modifie pas la réponse due à la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires par l'ATP. Cependant, après réadmission du calcium intracellulaire l'insuline inhibe l'augmentation de la vitesse initiale de l'influx calcique causé par l'ATP. Ceci confirme que l'insuline antagonise la réponse aux agonistes mobilisateurs de calcium dans les cellules HTC. Ce résultat est en accord avec ceux déjà obtenus dans les hépatocytes de rat en culture

primaire où l'insuline administrée 1 minute avant la phényléphrine, diminue la réponse calcique à la phényléphrine (article 1, résultat non montré).

Des études ont montré que les cellules HTC, comme les cultures primaires d'hépatocytes de rat, possèdent des CCNS qui laissent passer aussi bien le Na^+ , le K^+ , que le Ca^{2+} . Il a été proposé que ces canaux sont activés par les agonistes mobilisateurs de calcium tels que la vasopressine (agit sur le récepteur V_1) et l'ATP extracellulaire (ce dernier agissant sur les récepteurs purinergiques de type $\text{P}_{2\text{U}}$). On pense donc que ces canaux peuvent jouer un rôle dans l'entrée de Na^+ induite par les facteurs de croissance et dans la phase soutenue de l'augmentation de calcium induite par les agonistes mobilisateurs de calcium, phase dépendante d'une entrée de calcium du milieu extracellulaire (Lidofsky, 1993 ; 1995). Nous avons donc pensé que les CCNS seraient une cible possible de l'insuline et expliquerait l'entrée de Na^+ qui semble nécessaire à son action métabolique ou encore l'entrée de calcium que nous avons observé (Benzeroual et al., 1997). Cependant, le concept que l'insuline puisse activer les voies d'entrée du calcium similaires à ceux activés par les RCPGq est paradoxal puisqu'il est connu que l'insuline antagonise la réponse de ces derniers au niveau hépatique (van de Werve et al., 1977; Dehaye et al., 1981; Somogyi et al., 1992). Diverses hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'effet direct et interactif de l'insuline. Premièrement, il est possible que l'insuline agisse sur des CCNS différents de ceux qui sont activés par les RCPGq. En effet, des CCNS de 16 et 28 pS ont été observés (Lidofsky et al., 1993) mais leur contribution respective à l'influx de calcium induit par les RCPGq, par l'insuline ou par la vidange des réserves intracellulaires de calcium n'est pas encore clair. Il est donc concevable que

l'insuline stimule un type de canal pour provoquer l'influx tandis qu'elle inhibe un autre type qui est plus important pour l'entrée de calcium induit par les RCPGq. Par ailleurs, l'insuline et les RCPGq peuvent agir sur les mêmes CCNS mais avoir des effets distincts sur l'ouverture du canal. Il est concevable que l'insuline stimule ces canaux tout en les rendant plus susceptibles à l'inactivation lors de la stimulation subséquente par l'ATP. Enfin, il est connu que le récepteur à l'insuline active de nombreuses voies de signalisation (Lee et Pilch, 1994). L'effet direct et interactif de l'insuline sur l'entrée de calcium peut être médié par différentes voies de signalisation du récepteur.

a)- Rôle de la PKC dans les effets antagonistes de l'insuline envers les agonistes mobilisateurs de calcium

Même si d'autres études sont nécessaires pour clarifier ces mécanismes, nos résultats avec la thapsigargine fournissent des indications pour expliquer le ou les mécanisme (s) de cette interaction. Contrairement aux résultats obtenus avec l'ATP, l'augmentation de la vitesse initiale de l'influx calcique induit par la thapsigargine après réadmission du calcium n'est pas affectée par l'insuline. Ceci suggère que l'insuline ne module pas le ou les signaux qui lie la vidange des réserves intracellulaires à l'augmentation de l'entrée de calcium (Fasolato et al., 1994). La différence majeure entre la vidange des réserves intracellulaires par les agonistes et par la thapsigargine est l'implication de seconds messagers dans le premier cas mais pas dans le second. Comme on l'a vu auparavant, les CCNS présents sur les cellules HTC sont inhibés par la PKC après activation par les RCPGq, résultant en une rétro-action négative (Fitz et al., 1994). Par ailleurs, on sait que l'insuline aussi active la PKC (Cooper et al., 1990). L'hypothèse résultante

de ceci est que l'insuline peut amplifier l'activité PKC et par conséquent inhiber les CCNS (figure 10). L'insuline peut aussi moduler les CCNS en les rendant plus sensibles à l'inhibition normale par la PKC.

Récemment, il a été montré que la préincubation des hépatocytes en présence de la Dexf inhibe l'activation de la phosphorylase et l'augmentation du calcium cytosolique en réponse aux agents α_1 -adrénergiques probablement via l'activation de la PKC (Comte et al., 1997). Comme on l'a vu plus haut, l'insuline active la PKC et la Dexf exerce ces effets antagonistes à travers la PKC. On ne peut pas donc exclure un rôle pour la PKC dans le dialogue entre le récepteur à l'insuline et les agents mobilisateurs de calcium. D'autres expériences sont nécessaires pour éclaircir le rôle de PKC dans l'effet antagoniste de l'insuline sur les réponses hépatocellulaires des agonistes mobilisateurs de calcium.

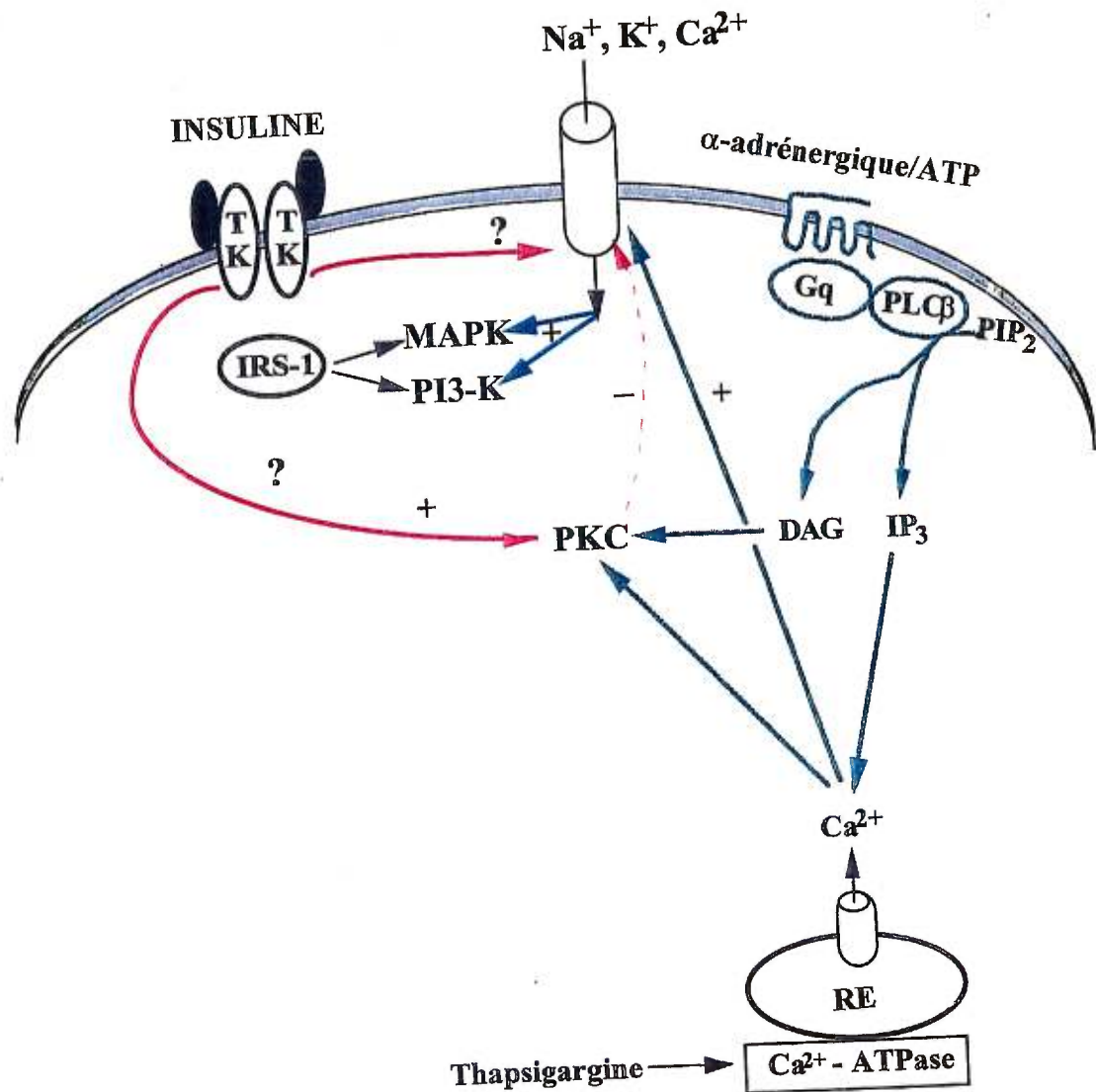


Figure 10. Mécanisme proposé pour l'effet interactif de l'insuline avec les agonistes mobilisateurs de calcium. L'insuline en se liant à son récepteur tyrosine kinase, induit l'activation de la PKC. Ceci accélère le processus d'inactivation des CCNS et résulte en une inhibition de l'influx de calcium.

5.2.2- Interaction au niveau intracellulaire

La MAPK est activée par l'insuline et aussi par les agonistes mobilisateurs de calcium. Selon le type de récepteurs et de cellules utilisées, différentes voies de transduction de signal mènent à l'activation de la MAPK par les agonistes. L'activation de cette enzyme résulte de l'association du complexe Grb2/Sos/Ras à l'IRS-1 ou Shc phosphorylés sur les résidus tyrosines en réponse à l'insuline, ou de l'activation de Ras ou Raf par la PKC en réponse aux agonistes des RCPGq (Crespo et al., 1994; Della Roca et al., 1997).

Même si la voie MAPK a été étudiée dans les hépatocytes en réponse à l'insuline et aux RCPGq (Benzeroual et al., 1997; Romanelli et van de Werve, 1997), à notre connaissance ce travail est le premier qui montre que la MAPK est phosphorylée en réponse à l'insuline et à l'ATP dans les cellules HTC. Cette phosphorylation par l'insuline est dépendante de la dose. Ceci montre que les cellules HTC expriment les éléments de signalisation moléculaires qui lient le récepteur de l'insuline, ainsi que celui des agonistes des RCPGq, à l'activation de la MAPK. La chélation du calcium extracellulaire par l'EGTA prévient partiellement la phosphorylation de la MAPK par l'insuline et l'ATP. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas clairs, nos données indiquent que le calcium extracellulaire joue un rôle dans l'action de l'ATP et de l'insuline sur la phosphorylation de la MAPK dans ces cellules. En effet, en présence d'EGTA où l'influx de calcium est prévenu, le calcium peut être mobilisé par l'IP₃ à partir des réserves intracellulaires après stimulation par l'ATP. Il semble donc que le signal calcique généré dans ces conditions suite à la stimulation de la PLCβ n'est pas suffisant pour activer complètement la MAPK. Dans ce cas, la

phosphorylation de la MAPK par l'ATP est au moins partiellement médiée par la PKC. Ceci pourrait être expliqué par un besoin d'influx de calcium pour une activation soutenue de la PKC (Rasmussen et al., 1995). L'activation de cette dernière dépend d'une production de DAG qui est biphasique. La première phase est due à l'hydrolyse du PIP₂ par la PLCβ et la deuxième à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la PLD (Nishizuka, 1992). La stimulation de cette phospholipase est dépendante à la fois du calcium et de la PKC qui a donc un effet rétro-positif sur son activation. L'augmentation transitoire du calcium intracellulaire induit par l'ATP en présence d'EGTA, ne pourrait donc pas être suffisant pour activer la PKC par le récepteur. Il semble donc que la PKC et le calcium puissent agir en synergie pour activer la MAPK. Ceci expliquerait pourquoi l'EGTA prévient partiellement la phosphorylation de la MAPK par l'ATP. Notre modèle est en accord avec les travaux de Romanelli et van de Werve. (1997) qui ont montré que les RCPGq sont capables de stimuler l'activation de la MAPK par une voie dépendante du calcium et de la PKC. Toutefois, on ne peut exclure un rôle de l'influx de calcium dans l'inhibition partielle de la MAPK. À l'opposé des hépatocytes de rat où l'EGTA bloque complètement l'activation de la MAPK par l'insuline (Benzeroual et al., 1997), il existe peut être, chez la lignée cellulaire HTC, une autre voie additive qui est indépendante du calcium et par laquelle la MAPK est phosphorylée.

Les interactions intracellulaires entre les différentes voies de signalisation fonctionnent comme des mécanismes d'augmentation ou de contre-régulation de l'action des hormones. Dans ce travail, nous avons utilisé les cellules HTC, qui expriment le récepteur à l'insuline et celui à l'ATP pour montrer que le

prétraitement des cellules avec l'insuline diminue significativement la phosphorylation de la MAPK en réponse à l'administration subséquente de l'ATP. Cet effet est obtenu après un temps très court (1 minute) de traitement avec l'insuline et résulte en un antagonisme entre ces deux récepteurs au niveau de l'activation de la MAPK. Le mécanisme de cette interaction n'est pas clair, mais on suppose que l'amplification de l'activité PKC par l'insuline résulte en une rétro-inhibition des CCNS et aussi en une diminution de la phosphorylation de la MAPK par les RCPGq. En effet, comme on l'a vu plus haut, la MAPK a besoin d'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire pour être complètement phosphorylée en réponse à la stimulation par les RCPGq. Nos résultats suggèrent donc que l'action de l'insuline sur les voies d'entrée de calcium participe dans l'antagonisme physiologique des réponses aux RCPGq dans le foie au niveau membranaire et intracellulaire.

5.3- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.3.1- EFFET DIRECT DE L'INSULINE

Nous avons démontré qu'au niveau hépatique, l'insuline augmente la $[Ca^{2+}]_i$ en provoquant un influx de calcium probablement via des CCNS dont l'identité exacte reste à définir. Il serait donc intéressant de caractériser ces canaux dans la lignée cellulaire HTC. Cette lignée cellulaire est stable et avantageuse pour des études électrophysiologiques et pour des manipulations moléculaires. En effet, les cellules HTC possèdent les voies de signalisation cellulaire à l'insuline et répondent de manière similaire aux hépatocytes au niveau des mesures de potentiel membranaire et de changement de calcium cytosolique. Malgré ces considérations, il faudrait d'abord vérifier que les cellules HTC répondent à l'insuline comme les hépatocytes au niveau des activités MAPK, PI3-K et en ce qui concerne la phosphorylation de l'IRS-1. Il faudrait vérifier aussi que ces activités démontrent la même sensibilité aux conditions qui bloquent l'influx de Ca^{2+} induit par l'insuline.

D'autre part, nos études indiquent clairement que l'influx de calcium joue un rôle important dans la stimulation de l'activité MAPK et PI3-K par le récepteur à l'insuline mais pas dans la phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1. Il serait également intéressant de poursuivre des études concernant les aspects moléculaires de couplage entre le récepteur à l'insuline et les voies d'entrée du calcium. L'hypothèse la plus probable est que le récepteur à l'insuline ouvre les CCNS et permet l'influx de calcium à travers l'activation des protéines G plus

particulièrement les isoformes de la protéine $G\alpha_{1-3}$. Comme on l'a vu dans le chapitre 3.2.C., il existe des évidences que les protéines Gi sensibles à la toxine pertussique soient impliquées dans l'influx de calcium dans les hépatocytes. De plus, d'autres évidences indiquent qu'une déficience en protéine $G\alpha_2$ entraîne la perte de plusieurs effets de l'insuline entre autre l'activation de la GS hépatique (Moxham et Malbon, 1996). Une approche alternative serait de tester l'effet de la toxine pertussique sur l'influx de calcium induit par l'insuline. L'autre alternative est d'utiliser des oligonucléotides antisens contre les isoformes $G\alpha_{1-3}$ pour s'assurer de l'implication de la protéine Gi dans l'action de l'insuline.

Comme on l'a vu plus haut, l'influx de calcium induit par l'insuline dans les cellules hépatiques est important pour stimuler l'activité MAPK et celle de la PI3-K. Cette nouvelle action peut donc être impliquée dans certains effets de l'insuline sur le métabolisme hépatique, soit directement soit à travers le dialogue avec les agonistes mobilisateurs de calcium. Il serait également nécessaire de vérifier dans les hépatocytes isolés de rat et mis en culture à court terme si la voie MAPK et la voie PI3-K sont toutes deux impliquées dans la synthèse de glycogène. Cela pourrait se faire en utilisant le PD098059 comme inhibiteur de la voie MAPK, et la wortmannine ou le LY294002 comme inhibiteurs de la voie PI3-K. De plus, il serait important de vérifier le rôle du calcium dans la synthèse de glycogène. Une approche intéressante est d'incuber les hépatocytes en présence du $[UDP-^{14}C]$ glucose et de mesurer son incorporation dans le glycogène en réponse à l'insuline. Ensuite, refaire la même expérience en présence des conditions qui bloquent l'influx de calcium (EGTA, nickel et gadolinium). Par ailleurs, d'autres études

devraient vérifier si la voie MAPK est dépendante de la voie PI3-K dans les hépatocytes.

Un rôle physiologique majeur de l'insuline est aussi de régler la production hépatique de glucose. Puisque l'influx de calcium est en partie impliqué dans le mécanisme d'action de l'insuline, il serait intéressant de vérifier l'importance de cet influx calcique dans l'inhibition de la production hépatique de glucose.

Le diabète est accompagné d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Comment ce phénomène est relié à la diminution de la sensibilité des cellules cibles envers l'insuline reste à définir. Des études éventuelles pourraient être poursuivies avec des hépatocytes de rat traité à la streptozotocine pour mesurer la mobilisation du calcium en réponse à l'insuline en absence et en présence de bloqueurs de CCNS.

5.3.2- EFFET INTERACTIF DE L'INSULINE

Nos résultats ont montré que malgré son action directe sur l'influx de calcium dans les hépatocytes et les cellules HTC, l'insuline antagonise les réponses calciques aux agonistes couplés aux protéines Gq. Cet effet antagoniste intervient au niveau de l'influx de calcium plutôt qu'au niveau des réserves intracellulaires. De plus, l'insuline antagonise l'influx de calcium induit par l'ATP et non celui induit par la thapsigargine. En effet, la thapsigargine vide les réserves intracellulaires de calcium et provoque un influx sans l'intermédiaire de seconds messagers. L'hypothèse résultante de ceci et que l'insuline antagonise peut être l'influx de calcium induit par les RCPGq en augmentant la rétroaction négative de

la PKC sur les CCNS. Il a été montré que les CCNS, qui forment d'autre part la voie primaire de l'influx de calcium dans les hépatocytes, sont inhibés par la PKC (Fitz et al., 1994). Il serait donc intéressant de déterminer le rôle de la PKC dans l'antagonisme par l'insuline de l'influx de calcium induit par les RCPGq. La disponibilité d'inhibiteurs spécifiques de la PKC tel que le RO31-8220 permettra d'évaluer le rôle de cette enzyme dans l'effet interactif de l'insuline.

Plusieurs isoformes de PKC ont déjà été trouvées dans les hépatocytes de rat et dans les cellules HTC (Tang et al., 1993 ; Croquet et al., 1996 ; Wang et al., 1996). Par contre on ne connaît pas clairement les isoformes qui sont activées par l'insuline dans ces cellules. Il serait donc important de les caractériser à l'aide d'anticorps spécifiques. Une approche intéressante pour déterminer l'implication des isoformes spécifiques dans l'antagonisme avec l'insuline des réponses calciques induites par les RCPGq serait d'utiliser des oligonucléotides antisens pour les isoformes de PKC déterminées précédemment par les expériences décrites ci-haut.

REFERENCES

- Agius L., Peak M., Beresford G., Alhabori M. and Thomas T.H. (1994) The role of ion content and cell volume in insulin action. *Biochem. Soc. Trans.* **22**:516-522.
- Akhtar R.A. and Perry M.C. (1979) Insulin action in isolated fat cells II effects of divalent cations on stimulation by insulin of protein synthesis, on inhibition of lipolysis by insulin, and on the binding of ^{125}I -Labeled insulin to isolated fat cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **585**:117-127.
- Alessi D.R., Kazlowski M.T., Weng Q.P., Morrice N. and Avruch J. (1998) 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Current. Biology.* **8**:69-81.
- Anderson N.G., Maller J.L., Tonks N.K. and Sturgill T.W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature.* **343**:651-653.
- Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., Bruning J.C., Haag B 3rd, Johnson R.S. And Kahn C.R. (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature.* **372**:186-190.
- Assimakopoulos-Jeannot F.D., Blackmore P.F. and Exton J.H. (1982) Studies of the interaction between glucagon and α -adrenergic agonists in the control of hepatic glucose output. *J. Biol. Chem.* **257**:3759-3765.
- Avruch J. (1989) In «insulin action». *A.R.Liss, New York.* Pp.65-77.
- Backer J.M., Schroeder G.G., Kahn C.R., Myers M.G., Wilden P.A., Cahill D.A. and White M.F. (1992) Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity maps to insulin receptors required for endogenous substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267**:1367-1374.
- Backer J.M., Schroeder G.G., Cahill D.A., Ullrich A., Siddle K. and White M.F. (1991) Cytoplasmic juxtamembrane region of the insulin receptor : a critical role in ATP binding, endogenous substrate phosphorylation, and insulin-stimulated bioeffects in CHO cells. *Biochemistry.* **30**:6366-6372.
- Baron V., Gautier N., Komoriya A., Hainaut P., Scimeca J.C., Mervic M., Lavielle S., Dolais-Kitabgi J. and Van Obberghen E. (1990) Insulin binding to its receptor induces a conformational change in the receptor C-terminus. *Biochemistry.* **29**:4634-4661.
- Begum N., Sussman K.E. and Draznin B. (1991) High levels of cytosolic free calcium inhibit dephosphorylation of insulin receptor and glycogen synthase. *Cell. Calcium.* **12**:423-430.

- Bernstein G., Blank J.L., Jhon D-H., Exton J.H., Rhee S.G. and Ross E.M. (1992) Phospholipase C- β_1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell*. **70**:411-418.
- Benzeroual K., van de Werve G., Meloche S., Mathé L., Romanelli A. and Haddad P. (1997) Insulin induces Ca^{2+} influx into isolated rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* **272**:G1425-G1432.
- Berridge M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. **361**:315-325.
- Berridge M.J. (1990) Calcium Oscillations. *J. Biol. Chem.* **265**:9583-9586.
- Berridge M.J. and Irvine R.F. (1989) Inositol phosphate and cell signaling. *Nature*. **341**:197-205.
- Berven L.A., Crouch M.F., Katsis F., Kemp B.E., Harland L.M. and Barritt G.J. (1995) Evidence that the pertussis-toxin trimeric GTP-binding protein $G_{i\alpha 2}$ is required for agonist- and store-activated Ca^{2+} inflow in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**:25893-25897.
- Berven L.A., Hughes B.P. and Barritt G.J. (1994) A slowly ADP-ribosylated pertussis toxin-sensitive GTP-binding regulatory protein is required for vasopressin-stimulated Ca^{2+} inflow in hepatocytes. *Biochem. J.* **299**:399-407.
- Berven L.A. and Barritt G.J. (1994) A role for a pertussis toxin-sensitive trimeric G-protein in store-operated Ca^{2+} inflow in hepatocytes. *FEBS Lett.* **346**:235-240.
- Bilodeau M., Provencher S.J., Néron S., Haddad P., Vallières S. and Gascon-Barré M. (1995) Hypocalcemia decreases the early and late responses to epidermal growth factor in rat hepatocytes. *Hepatology*. **21**:1576-1584.
- Bird G.S. and Putney J.W.Jr. (1993) Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidences for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry. *J.Biol.Chem.* **268**:21486-21488.
- Birnbaumer L. (1992) Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for β dimers as well as α subunits. *Cell*. **71**:1069-1072.
- Blackmore P.F. and exton J.H. (1986) Studies on the hepatic calcium-mobilizing activity of aluminum fluoride and glucagon. Modulation by cAMP and phorbol myristate acetate. *J. Biol. Chem.* **261**:11056-11063.
- Blackmore P.F. and Exton J.H. (1985) Mechanisms involved in the actions of calcium dependent hormones. *Biochemical Actions of Hormones*. vol **12**. edited by G. Litwak, pp 215-235. Academic press, New York.

Boggs K.P., Farese R.V. and Buse M.G. (1991) Insulin administration in vivo increases 1,2-diacylglycerol in rat skeletal muscle. *Endocrinology*. **128**:636-638.

Bonne D., Belhadj O. and Cohen P. (1977). Modulation by calcium of the insulin action and of the insulin-like effect of oxytocin on isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **75**:101-105.

Bonne D., Belhadj O. and Cohen P. (1978). Calcium as modulator of the hormonal-receptors-biological-response coupling system. Effects of Ca^{2+} ions on the insulin activated 2-deoxyglucose transport in rat fat cells. *Eur. J. Biochem.* **86**:261-266

Boulton T.G., Gregory J.S. and Cobb M.H. (1991) Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry*. **30**:278-286.

Boulton T.G., Yancopoulos G.D., Gregory J.S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J. and Cobb M.H. (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*. **249**:64-67.

Bouvier M., Leeb-Lundberg L.M.F., Benovic J.L., Caron M.G. and Lefkowitz R.J. (1987) Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II Effects of agonist occupancy on phosphorylation of α_1 - and β_2 -adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**:3106-3113.

Bristol J.A. and Rhee S.G. (1994) Regulation of phospholipase C- β isozymes by G-proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* **5**:402-406.

Burgering B.M. and Bos J.L. (1995) Regulation of ras-mediated signaling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**:18-22.

Burgering B.M.T. and Coffey P.J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. **376**:599-602.

Butta N., Urcelay E., Gonzalez-Manchon C., Parilla R. and Ayuso M.S. (1993) Pertussis toxin inhibition of the α_1 -adrenergic or vasopressin-induced Ca^{2+} fluxes in rat liver. *J. Biol. Chem.* **268**:6081-6089.

Bygrave F.L. and Benedetti A. (1993) Calcium: its modulation in liver by cross-talk between the actions of glucagon and calcium-mobilizing agonists. *Biochem. J.* **296**:1-14.

Carlsen J., Christiansen K. and Vinten J. (1997) Insulin stimulated glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes: effect of protein kinase inhibitors. *Cell. Signal.* **9**:447-450.

Carpenter C.L., Auger K.R., Duckworth B.C., Hou W.M., Schaffhausen B. and Cantley L.C. (1993) A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1657-1665.

Carroll M.P. and May W.S. (1994) Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **269**:1249-1256.

Cartee G.D., Briggs-Tung C. and Holloszy J.O. (1992) Diverse effects of calcium channel blockers on skeletal muscle glucose transport. *Am. J. Physiol.* **263**:R70-R75.

Cerpovicz P.F. and Ochs R.S. (1992) Effects of EGF on the mass of inositol 1,4,5-trisphosphate and SN(1,2)-diacylglycerol in freshly isolated rat hepatocytes: comparison with vasopressin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**:1055-1062

Challiss R.A.J., Crabtree B. and Newsholme E.A. (1987) Hormonal regulation of the glycogen / glucose-1-phosphate cycle in skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **163**:205-210.

Chan K.M. and Junger K.D. (1984) The effect of streptozotocin-induced diabetes on the plasma membrane calcium uptake activity of rat liver. *Diabetes.* **33**:1072-1077.

Chao T-S.O., Byron K.L., Lee K-M., Villereal M. and Rosner M.R. (1992) Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. *J. Biol. Chem.* **267**:19876-19883.

Chardin P. (1994) Domaines SH2 et SH3: un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *Medecines/Sciences.* **10**:709-712.

Cheatham B. and Kahn C.R. (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* **16**:117-142.

Cheatham B., Vlahos C.J., Cheatham L., Wang L., Blenis J. and Kahn C.R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70^{S6kinase}, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* **14**:4902-4911.

Chou C.K., Dull T.J., Russell D.S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A. and Rosen OM. (1987) Human insulin receptors mutated at the ATP-binding site lack protein tyrosine kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J. Biol. Chem.* **262**:1842-1847.

Christian J.B. and Posner B.I. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase and p70^{S6k} are required for insulin but not bisperoxovanadium 1,10-phenanthrene (bpVphen) inhibition of insulin-like growth factor binding protein gene expression. *J. Biol. Chem.* **272**:138-145

Christiansen K. and Carlsen J. (1995) Insertion of functional intact insulin receptors into hepatocytes. *Cell Signal*. **7**:583-589

Clapham D.E. (1993) A mysterious new influx factor? *Nature* **364**:763-764

Claret M. and Mauger J.P. (1994) Hormones, oscillations et vagues calciques. *Medecine/Sciences*. **10**:393-395.

Clarke J.F., Young P.W., Yonezawa K., Kasuga M. and Holman G.D. (1994) Inhibition of the translocation of GLUT 1 and GLUT 4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem. J.* **300**:631-635.

Clausen T., Elbrink J. and Martin B.R. (1974) Insulin controlling calcium distribution in muscle and fat cells. *Acta. Endocrinol.* **77**:137-143.

Clausen T. (1980) The role of calcium in the activation of the glucose transport system. *Cell. Calcium*. **1**:311-325.

Cobb M.H. and Goldsmith E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol.Chem.* **270**:14843-14846.

Cohen P., Alessi D.R. and Cross D.A.E. (1997) PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS. Lett.* **410**:3-10.

Cohen P. (1993) Dissection of the protein phosphorylation cascades involved in insulin and growth factor action. *Biochem. Soc. Trans.* **21**:555-567.

Cohen P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:453-508.

Cohen P. (1988) Protein phosphorylation and hormone action. *Proc. R. Soc. Lond.* **234**:115-144.

Cohen P. (1985) The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **151**:439-448.

Comte B., Romanelli A., Haddad P. and van de Werve. (1997) Dexfenfluramine modulates hepatic glycogen metabolism by a calcium-dependent pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**:842-848.

Cooper D.R., Hernandez H., Kuo J.Y. and Farese R.V. (1990) Insulin increases the synthesis of phospholipid and diacylglycerol and protein kinase C activity in rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**:486-494.

Cooper R.H., Coll K.E. and Williamson J.R. (1985) Differential effects of phorbol ester on phenylephrine and vasopressin-induced Ca^{2+} mobilization in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**:3281-3288

- Corvera S., Schwarz K.R., Graham R.M. and Garcia-Sainz J.A. (1986) Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell α_1 -adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *J. Biol. Chem.* **261**:520-526.
- Crespo P., Xu N., Simonds W.C. and Gutkind J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature.* **369**:418-420.
- Croft J.N. and Barritt G.J. (1990) The liver cell plasma membrane Ca^{2+} inflow systems exhibit a broad specificity for divalent metal ions. *Biochem. J.* **269**:579-587.
- Croquet F., Brethier A., Gil S. Davy J. and Feger J. (1996) Five isozymes of protein kinase C are expressed in normal and STZ-diabetic rat hepatocytes: effect of phorbol 12-myristate 13- acetate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1315**:163-168.
- Cross D.A.E., Watt P.W., Shaw M., van der Kaay J.V.D., Downes C.P., Holder J.C. and Cohen P. (1997) Insulin activates protein kinase B and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS. Lett.* **406**:211-215.
- Cross D.A.E., Alessi D.R., Vandenheede J.R., McDowell H.E., Hundal H.S. and Cohen P. (1994) The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem. J.* **303**:21-26.
- Czech M.P. (1989) Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell.* **59**:235-238.
- Czech M.P. (1985) The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* **47**:357-381.
- De Fea K. and Roth R.A. (1997) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:31400-31406.
- Dehaye J-P., Hughes B.P., Blackmore P.F. and Exton J.H. (1981) Insulin inhibition of α -adrenergic actions in liver. *Biochem. J.* **194**:949-956.
- Dekker L.V. and Parker P.J. (1994) Protein kinase C-a question of specificity. *Trends. Biochem. Sci.* **19**:73-77.
- Della-Rocca G.J., Van Biesen T., Daaka Y., Luttrell D.K., Luttrell L.M. and Lefkowitz R.J. (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G-protein-coupled receptors. Convergence of Gi - and Gq -mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:19125-19132.

- Dent P., Lavoigne A., Nakielny S., Caudwell F.B., Watt P. and Cohen P. (1990) The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature*. **348**:302-308.
- Denton R.M. and Tavaré J.M. (1995) Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The case for and against. *Eur. J. Biochem.* **227**:597-611.
- Dohlman H.G., Thorner J., Caron M.J. and Lefkowitz R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:653-688.
- Downes C.P. and McPhee C.H. (1990) Myo-inositol metabolites as cellular signals. *Eur. J. Biochem.* **193**:1-18.
- Downward J., Graves J.D., Warne P.H., Rayter S. and Cantrell D.A. (1990) Stimulation of p21^{ras} upon T-cell activation. *Nature*. **346**:719-723.
- Draznin B. (1993) Cytosolic calcium and insulin resistance. *Am. J. Kidney Dis.* **21**:32-38.
- Draznin B., Lewis D., Houlder N., Sherman N., Adamo M., Garvey WT., LeRoith D. and Sussman K. (1989) Mechanism of insulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes. *Endocrinology*. **125**:2341-2349.
- Draznin B., Sussman E., Eckel R.H., Kao M., Yost T. and Sherman N. (1988) Possible role of cytosolic free calcium concentration in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.* **82**:1848-1852.
- Draznin B., Kao M. and Sussman E. (1987a) Insulin and glyburide increase cytosolic free Ca²⁺ concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes*. **36**:174-178.
- Draznin B., Sussman E., Kao M., Lewis D. and Sherman N. (1987b) The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **262**:14385-14388.
- Duckworth B.C. and Cantley L.C. (1997) Conditionnal inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade by wortmannin. *J. Biol. Chem.* **272**:27665-27670.
- Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J. and Saltiel A.R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**:7686-7689.
- Duszynski J., Elensky M., Cheung J.Y., Tillotson D.L. and LaNoue K.F. (1995) Hormone-regulated Ca²⁺ channel in rat hepatocytes revealed by whole cell patch clamp. *Cell Calcium*. **18**:19-29.

Ebina Y., Araki E., Taira M., Shimada F., Mori M., Craik CS., Siddle K., Pierce SB., Roth RA. and Rutter WJ. (1987) Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:704-708.

Eck M.J., Dhe-Paganon S., Trub T., Nolte R.T. and Shoelson S.E. (1996) Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell.* **85**:695-705.

Eldar-Finkelman H. and Krebs E.G. (1997) Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:9660-9664.

Ellis L., Morgan D.O., Clauser E., Roth R.A. and Rutter W.J. (1987) A membrane-anchored cytoplasmic domain of the human insulin receptor mediates a constitutively elevated insulin-independent uptake of 2-deoxyglucose. *Mol. Endocrinol.* **1**:15-24.

Endemann G., Yonezawa K. and Roth R.A. (1990) Phosphatidylinositol kinase or an associated protein is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **265**:396-400.

Enslin H., Tokumitsu H., Stork P.J., Davis R.J. and Soderling T.R. (1996) Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:10803-10808.

Fain J.N., Li S., Litosch I. and Wallace M. (1984) Synergistic activation of rat hepatocyte glycogen phosphorylase by A23187 and phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**:88-94.

Farese R.V., Davis J.S., Barnes D.E., Standaert M.L., Babischkin J.S., Hock R., Rosic N.K. and Pollet R.J. (1985) The de novo phospholipid effect of insulin is associated with increases in diacylglycerol, but not inositol phosphate or cytosolic Ca^{2+} . *Biochem. J.* **231**:269-278.

Farese R.V., Standaert M.L., Arnold T., Yu B.Z., Ishizuka T., Hoffman J., Vila M. and Cooper D.R. (1992) The role of protein kinase C in insulin action. *Cell Signal.* **4**:133-143.

Fasolato C., Hoth M. and Penner R. (1993) A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.* **268**:20737-20740.

Fasolato C., Innocenti B. and Pozzan T. (1994) Receptor-activated Ca^{2+} influx: How many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **15**:77-83.

Fernando K.C. and Barritt G.J. (1994a) Characterisation of the inhibition of the hepatocyte receptor-activated Ca^{2+} inflow system by gadolinium and SK&F 96365. *Biochim. Biophys. Acta.* **1222**:383-389.

Fernando K.C. and Barritt G.J. (1994b) Evidence from studies of hepatocytes suspensions that store-operated Ca^{2+} inflow requires a pertussis toxin-sensitive trimeric G-protein. *Biochem. J.* **303**:351-356.

Fernando K.C. and Barritt G.J. (1995) Characterisation of the divalent cation channels of the hepatocyte plasma membrane receptor-activated Ca^{2+} inflow system using lanthanide ions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1268**:97-106.

Fewtrell C. (1993) Ca^{2+} oscillations in non-excitable cells. *Ann. Rev. Physiol.* **55**:427-454.

Fitz J.G., Sostman A.H. and Middleton J.P. (1994) Regulation of cation channels in liver cells by intracellular calcium and protein kinase C. *Am. J. Physiol.* **266**:G677-G684.

Fitz J.G. and Sostman A.H. (1994) Nucleotide receptors activate cation, potassium and chloride currents in a liver cell line. *Am. J. Physiol.* **266**:G544-G553.

Foot E.A. and Leighton B. (1994) Effects of calcium antagonists on insulin-mediated glucose metabolism in skeletal muscle. *Diabetes.* **43**:73-79.

Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C. and Toker A. (1997) Direct modulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* **275**:665-8.

Franke T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R. and Tsichlis P.N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell.* **81**:727-736.

Garcia-Sáinz J.A., Alcantara-Hernandez R., Robles-Flores M., Torres-Marquez M.E., Massillon D., Annabi B. and van de Werve G. (1992) Modulation by protein kinase C of the hormonal responsiveness of hepatocytes from lean (Fa/Fa?) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1135**:221-225.

Ginès P., Zamarripa J.L., Brown S.E.S., Wieder E.D., Nakamura T., Guzelian P.S., Schrier R.W., Heasley L.E. and Nemenoff R.A. (1995) Tyrosine kinase growth factor receptors but not seven-membrane-spanning receptors or phorbol esters activate mitogen-activated protein kinase in rat hepatocytes. *Hepatology.* **22**:1296-1303.

Gingras A. and Donzé O. (1995) Régulation par l'insuline de la synthèse protéique. *Médecine/Sciences.* **11**:866-872.

Graf J., Gautam A., and Boyer J.L. (1984) Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6516-6520

Garf J., Henderson R.M., Krumpholz B., and Boyer J.L. (1987) Cell membrane and transepithelial voltages and resistances in isolated rat hepatocyte couplets. *J. Membr. Biol.* **95**:241-254

Gautam A., Oi-Cheng N.G. and Boyer J.L. (1987) Isolated rat hepatocyte couplets in short-term culture: structural characteristics and plasma membrane reorganisation. *Hepatology* **7**:216-223

Graves C.B., Gale R.D., Laurino J.P. and McDonald J.M. (1976) The insulin receptor and calmodulin: calmodulin enhances insulin-mediated receptor kinase activity and insulin stimulates phosphorylation of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **261**:10429-10438.

Hadcock J.R., Port J.D., Gelman M.S. and Malbon CC. (1992) Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of β -adrenergic receptors in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **267**:26017-26022

Haimovici J., Beck J.S., Vallerand D., Molla-Hosseini C. and Haddad P. (1994) Different modulation of hepatocellular Na^+/H^+ exchange activity by insulin and EGF. *Am. J. Physiol.* **267**:G364-G370.

Hansen C.A., Yang L. and Williamson J.R. (1991) Mechanisms of receptor-mediated Ca^{2+} signaling in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **266**:18573-18579.

Hawes B.E., van Biesen T., Koch W.J., Luttrell L.M. and Lefkowitz R.J. (1995) Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **270**:17148-17153.

Haystead T.A.J., Weiel J.E., Litchfield D.W., Tsukitani Y., Fischer E.H. and Krebs E.G. (1990) Okadaic acid mimics the action of insulin in stimulating protein kinase activity in isolated adipocytes. The role of protein phosphatase 2a in attenuation of the signal. *J. Biol. Chem.* **265**:16571-16580.

Hei Y.J., McNeill J.H., Sanghera J.S., Diamond J., Bryerash M. and Pelech S.L. (1993) Characterization of insulin-stimulated seryl/threonyl protein kinases in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **268**:13203-13213.

Heller-Harrison R.A., Morin M., Guilherme A. and Czeck M.P. (1996) Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* **271**:10200-10204

Hernandez-Sotamayor S.M.T., Macias-Silva M., Plebanski M. and Garcia-Sainz J.A. (1988) Homologous and heterologous β -adrenergic desensitization in hepatocytes. Additivity and effect of pertussis toxin. *Biochim. Biophys. Acta.* **972**:311-319.

- Hers H.G. (1990) Mechanisms of blood glucose homeostasis. *J. Inher. Metab. Disease*. **13**:395-410.
- Hess S.L., Suchin C.R. and Saltiel A.R. (1991) The specific protein phosphatase inhibitor okadaic acid differentially modulates insulin action. *J. Cell. Biochem*. **45**:374-380.
- Hoth M. and Penner R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. **355**:353-356.
- Hoth M., Fasolato C. and Penner R. (1993) Ion channels and calcium signaling in mast cells. *Ann. NY. Acad. Sci*. **707**:198-200.
- Hu Q., Klippel A., Muslin A.J., Fantl W.J. and Williams L.T. (1995) Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase. *Science*. **268**:100-102.
- Huang S., Maher V.M. and McCormick J.J. (1995) Extracellular Ca^{2+} stimulates the activation of mitogen-activated protein kinase and cell growth. *Biochem. J*. **310**:881-885.
- Hughes B.P., Both K., Harland L., Hunt J., Hurst K.M., Lewis M. and Barritt G.J. (1993) Identification of an mRNA species which encodes a voltage-operated Ca^{2+} channel in rat liver mRNA. *Biochem. Mol. Biol. Intl*. **31**:193-200.
- Ioannoni B., Hughes B.P. and Barritt G.J. (1991) Identification of a class of low affinity binding sites for verapamil on liver plasma membranes. *Biochem. Pharmacol*. **42**:2239-2241.
- Irvine R.F. (1990) 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphate a possible mechanism. *FEBS Lett*. **263**:5-9.
- Irvine R.F. (1991) Inositol tetrakisphosphate as a second messenger: confusions, contradictions, and a potential resolution. *Bioessays*. **13**:419-427.
- Irvine F., Wallace A.V., Sarawak S.R. and Houslay M.D. (1993) Extracellular calcium modulates insulin's action on enzymes controlling cyclic AMP metabolism in intact hepatocytes. *Biochem. J*. **293**:249-253.
- Irvine R.F. (1990) 'Quantal' Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphate a possible mechanism. *FEBS Lett*. **263**:5-9.
- Joyal J.L., Burbs D.J., Pons S., Matter W.F., Vlahos C.J., White M.F. and Sacks D. (1997) Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem*. **272**:28183-28186.

- Jullien D., Tanti J.F., Heydrick S.J., Gautier N., Gremeaux T., Van Obberghen E. and Le Marchand-Brustel Y. (1993) Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**:15246-15251.
- Kahn R. (1997) Insulin receptors and insulin signaling in normal and disease states. *International Text Book of Diabetes Mellitus, Second Edition*. Edited by K.G.M.M. Alberti, P. Zimmet, R.A. DeFronzo and H. Keen. John Wiley and Sons Ltd. p:437-468.
- Kanzaki M., Lindorfer M.A., Garrison J.C. and Kojima I. (1997) Activation of the calcium-permeable cation channel, CD20 by alpha subunits of the Gi protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 14733-14739.
- Kapeller R., Chen K., Yoakim M., Schaffhausen B.S., Backer J.M., White M.F., Cantley L.C. and Ruderman N.B. (1991) Mutations in the juxtamembrane region of the insulin receptor impair activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Mol. Endocrinol.* **5**:769-777.
- Karam J.H. (1995) Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. In: *Basic and Clinical Pharmacology*, edited by B-G. Katzung. Toronto, Canada: Prentice Hall. p:637-654.
- Kass G.E.N., Llopis J., Chow S.C., Duddy S.K. and Orrenius. (1990) Receptor-operated calcium influx in rat hepatocytes: identification and characterisation using manganese. *J. Biol. Chem.* **265**:17486-17492.
- Kasuga M., Hedo J.A., Yamada K.M. and Kahn C.R. (1982) The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J. Biol. Chem.* **257**:10392-10399.
- Kilgour E. (1993) A role for inositol-glycan mediators and G-proteins in insulin action. *Cell. Signal.* **5**:97-105.
- King M.J. and Sale G.J. (1990) Dephosphorylation of insulin-receptor autophosphorylation sites by particulate and soluble phosphotyrosyl-protein phosphatase. *Biochem. J.* **266**:251-259.
- Klip A. (1984) Is intracellular Ca^{2+} involved in insulin stimulation of sugar transport? fact and prejudice. *Can. J. Biochem.* **62**:1228-1236.
- Koch W.J., Hawes B.E., Allen L.F. and Lefkowitz R.J. (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by $G_{\beta\gamma}$ activation of p21^{ras}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:12706-12710.
- Kojima I., Mogami H. and Ogata E. (1992) Oscillation of cytoplasmic free calcium concentration induced by insulin-like growth factor-1. *Am. J. Physiol.* **262**:E307-E311.

Kojima I., Matsunaga H., Kurokawa K., Ogata E. and Nishimoto I. (1988) Calcium influx: an intracellular message of the mitogenic action of insulin-like growth factor-1. *J. Biol. Chem.* **263**:16561-16567.

Kraus-Friedmann N. (1984) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol. Rev.* **64**:170-258.

Lam K., Carpenter C.L., Ruderman N.B., Friel J.C. and Kelly K.L. (1994) The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1 stimulation by insulin and inhibition by wortmannin. *J. Biol. Chem.* **269** : 20648-20652.

Lange-Carter C.A., Pleiman C.M., Gardner A.M., Blumer K.J. and Johnson G.L. (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science.* **260**:315-319.

Langlois W.J., Sasaoka T., Saltiel A.R. and Olefsky J.M. (1995) Negative feedback regulation and desensitization of insulin-and epidermal growth factor-stimulated p21^{ras} activation. *J. Biol. Chem.* **270**:25320-25323.

Lazar D.F., Wiese R.J., Brady M.J., Corley Mastick C., Waters S.B., Yamauchi K., Pessin J.E., Cuatrecasas P. and Saltiel A.R. (1995) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilisation by insulin. *J. Biol. Chem.* **270**:20801-20807.

Lee J. and Pilch P.F. (1994) The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am. J. Physiol.* **266**:C319-C334.

Lesley A., Blair C. and John Marshall. (1997) IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron.* **19**:421-429.

Lev S., Moreno H., Martinez R., Canoll P., Peles E., Musacchio J.M., Plowman G.D., Rudy B. and Schlessinger J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature.* **376**:737-745.

Levy J., Gavin JR III. and Sowers JR. (1994) Diabetes mellitus, function, and signaling. *Am. J. Physiol.* **266**:C319-C334.

Lidofsky S.D., Sostman A. and Fitz J.G. (1997) Regulation of cation-selective channels in liver cells. *J. Membr. Biol.* **157**:231-236.

Lidofsky S.D. (1995) Properties of hepatocellular cation-selective channels suggest a prominent role in receptor-mediated calcium entry. *Hepatology.* **22**:306A.

Lidofsky S.D., Xie M.H., Sostman A., Scharschmidt B.F. and Fitz J.G. (1993) Vasopressin increases cytosolic sodium concentration in hepatocytes and activates calcium influx through cation-selective channels. *J. Biol. Chem.* **268**:14632-14636.

- Lienhard G.E., Slot J.W., James D.E. and Mueckler M.M. (1992) How cells absorb glucose. *Scientific American*. **266**:86-91.
- Llopis J., Kass G.E.N., Gahn A. and Orrenius S. (1992) Evidence for two pathways of receptor-mediated calcium entry in hepatocytes. *Biochem. J.* **284**:243-247.
- Low M.G. and Saltiel A.R. (1988) Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science*. **239**:268-275.
- Margolis B. and Skolnik E.Y. (1994) Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**:1288-1299.
- Marshall C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**:179-185.
- Marshall I.C.B. and Taylor C.W. (1993) Biphasic effects of cytosolic Ca^{2+} on $Ins(1,4,5)P_3$ -stimulated Ca^{2+} mobilization in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **268**:13214-13220
- Masry S.G. and Smogorzewski M. (1997) Role of elevated cytosolic calcium in the pathogenesis of complication in diabetes mellitus. *Miner. Electrolyte. Metab.* **23**:253-260.
- Massague J.P., Pilch P.F. and Czech M.P. (1980) Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometrics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:7137-7141.
- Mathé L., Vallerand D. and Haddad P. (1997) Insulin induces calcium influx into HTC cells through a non-selective cationic conductive pathway. *Hepatology.* **26**:263A
- Mauger J.P. and Claret M. (1988) Calcium channel in hepatocytes. *J. Hepatology.* **7**:278-282.
- Melien O., Thoresen G.H., Sandnes O., Ostby E. and Christoffersen T. (1998) Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F₂alpha in hepatocytes is sustained, and like the effect of epidermal growth factor, mediated through pertussis toxin-sensitive mechanism. *J. Cell. Biol.* **175**:348-358.
- Mendez R., Kollmorgen G., White M.F. and Rhoads. (1997) Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5184-5192
- Mithieux G., Daniele N., Payrastra B. and Zitoun C. (1998) Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **273**:17-19.

- Morgan N.G., Shipp C.C. and Exton J.H. (1983) Studies on the mechanism of inhibition of hepatic cAMP accumulation by vasopressin. *FEBS. Lett.* **163**:277-281.
- Morris N.J., Young P. and Houslay M.D. (1995) Insulin inhibits the phosphorylation of alpha-G(i) in intact hepatocytes. *Biochem. J.* **308**:693-696.
- Moxham C.M. and Malbon C.C. (1996) Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G_{iα2}. *Nature.* **379**:840-844.
- Murakami M.S. and Rosen O.R. (1991) The role of insulin receptor autophosphorylation in signal transduction. *J. Biol. Chem.* **266**:22653-22660.
- Myer T. and Stryer L. (1991) Calcium spiking. *Annu. Rev. of Biophys. Biophysic. Chem.* **20**:153-174.
- Myers M.G. Jr., Cheatham B., Fisher T.L., Jachna B.R., Kahn C.R., Backer J.M. and White M.F. (1996) Common and distinct elements in insulin and PDGF signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **766**:369-387.
- Myers M.G.Jr., Grammer T.C. Brooks J. Glasheen E.M., Wang L.M., Sun X.J., Blenis J., Pierce J.H. and White M.F. (1995) The pleckstrin homology domain in insulin receptor substrate -1 sensitizes insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **270**:11715-11718.
- Myers M.G.Jr., Wang L.M., Sun X.J. Zhang Y., Yenush L., Schlessinger J., Pierce J.H. and White M.F. (1994) The role of IRS-1/GRB2 complexes in insulin signaling. *Mol. Cell. Biol.* **14**:3577-3587.
- Myers M.G.Jr., Backer J.M., Sun X.J. Shoelson S., Hu P., Schlessinger J., Yoakim M., Schaffhausen B. and White MF. (1992) IRS-1 activates the phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with the src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:10350-10354.
- Nakanishi H., Brewer K.A. and Exton J.H. (1993) Activation of the ζ isoforme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **268** :13-16.
- Nathanson M.H., Gautam A., Bruck R., Isales C.M. and Boyer J.L. (1992) Effects of Ca²⁺ agonists on cytosolic Ca²⁺ in isolated hepatocytes and on bile secretion in the isolated perfused liver. *Hepatology.* **15**:107-116.
- Navé B.T., Siddle K. and Shepherd P.R. (1996) Phorbol esters stimulate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate production in 3T3-L1 adipocytes: implications for stimulation of glucose transport. *Biochem. J.* **318**:203-205
- Nie L., Kanzaki M., Shibata H. and Kojima I. (1998) Activation of calcium-permeable cation channel by insulin in chinese Hamster Ovary cells expressing human insulin receptor. *Endocrinology.* **139**:179-188.

- Nishizuka Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. **258**:607-614.
- Ohno S., Akita Y., Hata A., Osada S., Kubo K., Konno Y., Akimoto K., Mizuno K., Saido T., Kuroki T. and Suzuki K. (1991) Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family: two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv. Enzyme. Regul.* **31**:287-303.
- Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., Hazeki O. and Ui M. (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* **269**:3568-3573.
- Osada S., Saji S., Nakamura T. and Nozawa Y. (1992) Cytosolic calcium oscillations induced by hepatocyte growth factor (HGF) in single fura-2-loaded cultured hepatocytes: effects of extracellular calcium and protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1135**:229-232.
- Parekh A.B. and Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Pharmacol. Rev.* **77**:901-930.
- Parker P.J. and Waterfield M.D. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: A novel effecteur. *Cell Growth and differentiation.* **3**:747-752.
- Paz K., Hemi R., LeRoith D., Karasik A., Elhanany E., Kanety H. and Zick Y. (1997) A molecular basis for insulin resistance-elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**:29911-29918.
- Paz K., Voliovitch H., Hadari Y.R., Roberts C.T., LeRoith D. and Zick Y. (1996) Interaction between the insulin receptor and its downstream effectors. *J. Biol. Chem.* **271**:6998-7003.
- Peak M., Yeaman S.J. and Agius L. (1993) Epidermal growth factor and insulin stimulate MAP kinase activity in cultured hepatocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **21**:494S
- Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., Mcglade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T. and Pelicci PG. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell.* **70**:93-104.
- Petritsch C., Woscholski R., Edelmann H.M., Parker P.J. and Ballou L.M. (1995) Selective inhibitor of p70 S6 kinase activation by phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Eur. J. Biochem.* **230**:431-438

- Pilkis S.J. and Granner D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:885-909.
- Pinget M. and Roques M. (1996) Les voies de transmission du signal insuline. *Medecine/Sciences.* **12**:1247-1252.
- Plehwe W.E., Williams P.F., Caterson I.D., Harrison L.C. and Turtle J.R. (1983) Calcium-dependence of insulin receptor phosphorylation. *Biochem. J.* **214**:361-366.
- Pugazhenth S. and Khandelwal R.L. (1995) Regulation of glycogen synthase activation in isolated hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **149/150**:95-101.
- Pullen N. and Thomas G. (1997) The modular phosphorylation and activation of p70^{s6k}. *FEBS. Lett.* **410**:78-82.
- Putney J.W.Jr. (1997) Type 3 inositol-1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium.* **21**:257-261.
- Quon M.J., Butte A.J., Zarnowski M.J. Sesti G., Cushman S.W. and Taylor S.I. (1994) Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. *J. Biol. Chem.* **269**:27920-27924.
- Randriamampita C. and Tsien R.Y. (1995) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature.* **364**:809-814.
- Rasmussen H., Isales C.M., Calle R., Throckmorton D., Anderson M., Gasalla-Herraiz J. and McCarthy R. (1995) Diacylglycerol production, Ca²⁺ influx, and protein kinase C activation in sustained cellular responses. *Endocrine Rev.* **16**:649-681.
- Ray L.B. and Sturgill T.W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* **84**:1502-1506
- Ray L.B. and Sturgill T.W. (1988) Insulin-stimulated microtubule associated protein kinase is detectable by analytical gel chromatography as a 35-kDa protein in myocytes, adipocytes and hepatocytes. *Arch Biochem. Biophys.* **262**:307-313.
- Rens-Damiano S. and Hamm H.E. (1995) Structure and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB. J.* **9**:1059-1066
- Rhee S.G., Kim H., Suh P.G. and Choi W.C. (1991) Multiple forms of phosphoinositide-specific phospholipase C and different modes of activation. *Biochem Soc. Trans.* **19**:337-342.

- Roach P.J. and Goldman M. (1983) Modification of glycogen synthase activity in isolated rat hepatocytes by tumor-promoting phorbol esters: evidence for differential regulation of glycogen synthase and phosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:7170-7172.
- Rodorf-Nikolic T., Van Horn D.J., Chen D., White M.F. and Backer J.M. (1995) Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase by tyrosyl phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**:3662-3666.
- Rodriguez-Viciano P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaeserbraeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D. and Downward J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* **370**:527-532.
- Rogers K.S., Menon R.A., Mohan C., Geiger P.J. and Bessman S.P. (1991) Extracellular phosphate requirement for insulin on isolated rat hepatocytes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **45**:344-349.
- Romanelli A. and van de Werve G. (1997) Activation of mitogen-activated protein kinase in freshly isolated rat hepatocytes both by a calcium- and protein kinase C-dependent pathway. *Metabolism.* **46**:548-555.
- Rosen L.B. and Greenberg M.E. (1996) Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:1113-1118.
- Rosen L.B., Ginty D.D., Weber M.J. and Greenberg M.E. (1994) Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron.* **12**:1207-1221.
- Rother K.I., Imai Y., Caruso M., Bequinet F., Formisano P. and Accili D. (1998) Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **273**:17491-17497.
- Ruderman N., Kapeller R., White M.F. and Cantley L.C. (1990) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **87** :1411-1415.
- Rusanescu G., Qi H., Thomas S.M., Brugge J.S. and Halegoua S. (1995) Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron* **15**:1415-1425
- Rutter G.A., White M.R.H. and Tavaré J.M. (1995) Involvement of MAP kinase in insulin signaling revealed by non-invasive imaging of luciferase gene expression in single living cells. *Curr. Biol.* **5**:890-899.
- Sacks D.B., Davis H.W., Crimmins D.L. and McDonald J.M. (1992) Insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin. *Biochem. J.* **286**:211-216
- Sadoshima J., Qiu Z., Morgan J.P. and Izumo S. (1995) Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate

tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kDa S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca^{2+} -dependent signaling. *Circ. Res.* **76**:1-15.

Saito Y., Vandenhede J., and Cohen P. (1994) The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase-3 in A431 cells. *Biochem. J.* **303**:27-31

Saltiel A.R. and Cuatrecasas P. (1986) Insulin stimulates the generation from hepatic membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:5793-5797.

Sanchez-Bueno A., Greenwood M.R., Varela-Nieto I., Marrero I., Gil B., Mato J.M. and Cobbold P.H. (1997) Inositol-phosphoglycan inhibits calcium oscillations in hepatocytes by reducing calcium entry. *Cell Calcium.* **21**:125-133.

Seger R., Biener Y., Feinstein R., Hanoch T., Gazit A. and Zick Y. (1995) Differential activation of mitogen-activated protein kinase and S6 kinase signaling pathway by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and insulin. *J. Biol. Chem.* **270**:28325-28330.

Seger R. and Kerbs E.G. (1995) The MAPK cascade. *FASEB. J.* **9**:726-735.

Shepherd P.R., Nave B.T. and Siddle K. (1995) Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* **305**:25-28.

Siddiqui R.A. and Exton J.H. (1992) Oleate stimulation of diacylglycerol formation from phosphatidylcholine through effects on phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* **210**: 601-607.

Singh S.S., Chauhan A., Brockerhoff H. and Chauhan V.P.S. (1995) Differential effects of spermine on phosphatidylinositol phosphate 5-kinase. *Life. Sci.* **57**:685-694.

Singh S.S., Chauhan A., Brockerhoff H. and Chauhan V.P.S. (1993) Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 104-112.

Sjolaner A., Yamamoto K., Huber B.E. and Lapetina E.G. (1991) Association of p21^{ras} with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:7908-7912.

Skolnic E.Y., Margolis B., Mohammadi M., Lowenstein E., Fisher R., Drepps A., Ullrich A. and Schlessinger J. (1991) Cloning of PI 3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell.* **65**:83-90

Somogyi R., Zhao M. and Stucki J.W. (1992) Modulation of $[Ca^{2+}]$ oscillations in hepatocytes results from cross-talk among second messengers. *Biochem. J.* **186**:869-877.

Sozeri O., Vollmer K., Liyanage M., Frith D., Kour G., Mark G.E. 3rd. and Stabel S. (1992) Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene.* **7**:2259-2262.

Standaert M.L., Galloway L., Karnam P., Baudyopathyay G., Moscat J. and Farese R.V. (1997) Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* **272**:30075-82.

Striggow F. and Bohnensack R. (1993) Verapamil and diltiazem inhibit receptor-operated calcium channels and intracellular calcium oscillations in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **3**:318-341.

Strunecka A. (1985) Cytosolic free Ca^{2+} level in isolated hepatocytes: the effect of insulin. *Gen. Physiol. Biophys.* **4**:505-516.

Studer R.K. and Ganas L. (1989) Effect of diabetes on hormone-stimulated and basal hepatocytes calcium metabolism. *Endocrinology.* **125**:2421-2433.

Sugimoto S., Wandless T.J., Shoelson S.E., Neel B.G. and Walch C.T. (1994) Activation of the SH2-containing protein tyrosine phosphatase, SH-PTP2, by phosphotyrosine-containing peptides derived from insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* **269**:13614-13622.

Sun X.J., Wang L.M., Zhang Y., Yenush L., Myers MGJr., Glasheen E., Lane WS., Pierce JH. and White MF. (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature.* **377**:173-177.

Sun X.J., Rothenberg P.L., Kahn C.R., Backer JM., Araki E., Wilden PA., Cahill DA., Goldstein BJ. and White MF. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* **352**:73-77.

Tanaka Y., Hayashi N., Kaneko A., Ito T., Miyoshi E., Sasaki Y., Fusamoto H. and Kamada T. (1992) Epidermal growth factor induces dose-dependent calcium oscillations in single fura-2 loaded hepatocytes. *Hepatology.* **16**:479-486.

Tang E.Y., Parker P.J., Beattie J. and Houslay M.D. (1993) Diabetes induces selective alterations in the expression of protein kinase C isoforms in hepatocytes. *FEBS Lett.* **326**:117-123.

Tanti J.F., Gremeaux T., Van Obberghen E. and Le Marchand-Brustel Y. (1994) Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **269**:6051-7.

Tartare-Deckert S., Swaka-Verhelle D., Murcada J. and Van Obberghen E. (1995) Evidence for a differential interaction of Shc and the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) with the insulin-like growth factor (IGF-1) receptor in the yeast two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* **270**:23456-23460.

Taussig R., Iniguez-Lluhi J.A. and Gilman A.G. (1993) Inhibition of Adenylyl Cyclase by G (I-alpha). *Science.* **261**:218-221.

Taylor S.J. and Exton J.H. (1987) Guanine-nucleotide and hormone regulation of polyphosphoinositide phospholipase C activity of rat liver plasma membrane. Bivalent-cation and phospholipid requirements. *Biochem. J.* **248**:791-799.

Thomas A.P., Martin-requero. and Williamson J.R. (1985) Interactions between insulin and α_1 -adrenergic agents in the regulation of glycogen metabolism in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**:5963-5973.

Thomas A.P. and Williamson J.R. (1983) Effects of insulin on phenylephrine-induced activation of phosphorylase and phosphatidylinositol turnover in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **258**:1411-1414.

Thomas S.M., De Marco M., D'Arcangelo S., Halegoua S. and Brugge J.S. (1992) Ras is essential for nerve growth factor-and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP Kinases. *Cell.* **68**:1031-1040.

Tobe K., Kadowaki T., Hara K., Gotoh Y., Kosako H., Matsuda S., Tamemoto H., Ueki K., Akanuma Y., Nishida E. and Yasaki Y. (1992) Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J. Biol. Chem.* **267**:21089-21097.

Toker A. and Cantley L.C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositides-3-OH kinase. *Nature.* **387**:673-676.

Toker A., Meyer M., Reddy K.K., Falck J.R., Aneja R., Aneja S., Parra A., Burns D.J., Ballas L.M. and Cantley C. (1994) Activation of protein kinase C family members by the novel phosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *J. Biol. Chem.* **269**:32358-32367.

Touyz R.M. and Schiffrin. (1994) Insulin-induced Ca²⁺ transport is altered in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* **23**:931-935.

Towns R., Kostyo J.L. and Martin D. (1993) The stimulatory effect of insulin on diacylglycerol generation in adipocyte membrane from ob/ob mice by growth hormone. *Endocrinology.* **132**:1671-1676.

Treves S., De Mattei M., Landfredi M., Villa A., Green N.M., Maclellan D.H., Meldolesi J. and Pozzan T. (1990) Calreticulin is a candidate for a

- calsequestrin-like function in Ca²⁺-storage compartments (calciosomes) of liver and brain. *Biochem. J.* **271**:473-480.
- Tsien RY., Pozzan T. and Rink TY. (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.* **94**:325-334.
- Uhl J.J., Chan S. and Stucki J.W. (1994) Anti-diabetic biguanides inhibit hormone-induced intracellular Ca²⁺ concentration oscillations in rat hepatocytes. *Biochem. J.* **304**:561-567.
- van de Werve G. (1989) Liver glucose-6-phosphatase activity is modulated by physiological intracellular Ca²⁺ concentrations. *J. Biol. Chem.* **264**:6033-6036.
- van de Werve G., Zaninetti D., Lang U., Valloton M. and Jeanrenaud B. (1987) Identification of a major defect in insulin-resistant tissues of genetically obese (fa/fa) rats: impaired protein kinase C. *Diabetes.* **36**:310-314.
- van de Werve G., Assimacopoulos-Jeannet F. and Jeanrenaud B. (1983) Altered liver glycogen metabolism in fed genetically obese mice. *Biochem. J.* **216**:273-280.
- van de Werve G., Stalmans W. and Hers H.G. (1977) The effect of insulin on the glycogenolytic cascade and on the activity of glycogen synthase in the liver of anaesthetized rabbits. *Biochem. J.* **162**:143-146.
- van Renterghem B., Browning M.D. and Maller J.L. (1994) Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase A and C in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **269**:24666-24672.
- Wang J., Auger K.R., Jarvis L., Shi Y. and Roberts T.M. (1995) Direct association of Grb2 with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **270**:12774-12780.
- Waters S.B. and Pessin J.E. (1996) Insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1 and IRS2) : What a tangled web we weave. *Trends Cell. Biol.* **6**:1-4.
- Westfall M.V. and Sayeed M.H. (1990) Effect of Ca²⁺- channel agonists and antagonists on skeletal muscle sugar transport. *Am. J. Physiol.* **258**:R462-R468.
- White M.F. (1997) The insulin signalling system and the IRS protein. *Diabetologia.* **2**:S2-17
- White M.F. and Kahn C.R. (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* **269**:1-4.
- White M.F., Livingston J.N., Backer J.M., Lauris V., Dull T.J., Ullrich A. and Kahn C.R. (1988a) Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits

signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell*. **54**:641-649.

White M.F., Shoelson S.E., Keutmann H. and Kahn C.R. (1988b) A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **263**:2969-2980.

White M.F., Maron R. and Kahn C.R. (1985) Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of Mr 185 000 protein in intact cells. *Nature*. **318**:183-186.

Whitman M., Kaplan D.R., Schaffhausen B., Cantley L. and Roberts T.M. (1985) Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*. **315**:239-242.

Williams P.F., Caterson I.D., Cooney G.J., Zilkens RR. and Turtle JR. (1990) High affinity insulin binding and insulin receptor-effector coupling: modulation by Ca^{2+} . *Cell Calcium*. **11**:547-556.

Wolf G., Trub T., Ottinger E., Groninga L., Lynch A., White MF., Miyaka M., Lee J. and Shoelson SE. (1995) PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J. Biol. Chem.* **270**:27407-27410.

Wolf M., LeVine H.III., May W.S.J., Cuatrecasas P. and Sahyoun N. (1985) A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters. *Nature*. **317**:546-549.

Wood K.W., Sarecki C., Roberts T.M. and Blenis J. (1992) Ras mediates nerve growth factor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1 and RSK. *Cell*. **68**:1041-1050.

Woods N.M., Cuthbertson K.S.R. and Cobbold P.H. (1987) Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes. *Cell Calcium*. **8**:79-100.

Woods N.M., Cuthbertson K.S.R. and Cobbold P.H. (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*. **319**:600-602.

Xiao S., Rose D.W., Sasaoka T., Maegawa H., Burke TRJr., Roller PP., Shoelson SE. and Olefsky JM. (1994) Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.* **269**:21244-21248.

Yamauchi T., Tobe K., Tamemoto H., Ueki K., Kaburagi Y., Yamamoto-Honda R., Takahashi Y., Yoshizawa F., Aizawa S., Akanuma Y., Sonenberg N., Yazaki Y. and Kadowaki T. (1996) Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant. Insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3074-3084.

Yang-Feng T.L., Francke U. and Ullrich A. (1985) Gene for human insulin receptor: localisation to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. *Science*. **228**:728-731.

Young J.C. and Balon T.W. (1997) Role of dihydropyridine sensitive calcium channels in glucose transport in skeletal muscle. *Life Science*. **61**:335-342.