

## Contribution de la Calcium-ATPase de la Membrane Plasmique dans la Sécrétion d'Insuline dans les îlots Pancréatiques de Rat

### [ Contribution of Plasma Membrane Calcium-ATPase on Insulin Secretion in Rat Pancreatic Islets ]

**Adama KAMAGATE**

Laboratoire de Physiologie animale, de Pharmacologie et de Phytothérapie,  
UFR SN, Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the *Creative Commons Attribution License*, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** The increase in intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) represents a major event in the process of insulin secretion. The Plasma Membrane Calcium ATPase (PMCA) are equipped with a series of isoforms that may be tissue specific. It has been suggested that there might be a difference in activity between the isoforms and that some of them could play a fundamental role in the operation of the  $\beta$  cell. The PMCA are regulated by calmodulin (CaM), the phospholipid acid, protein kinase, protease, and G protein, and by oligomerisation. CaM activates the pump and this activation effect will be limited by alternative splicing at site C that is their binding domain. Acidic phospholipids are stimulators of PMCA. But, alternative splicing at site A could therefore affect the regulation of PMCA isoforms by phospholipids by altering accessibility of phospholipids to their binding domain. In contrast, the PMCA are inhibited by lanthanum and vanadate ions, by calmodulin antagonists, N-ethylmaleimide and derivatives of fluorescein. However, the experiments conducted showed that the suppression of the oscillations of  $[Ca^{2+}]_i$  is accompanied by an increase in glucose metabolism and insulin secretion but which continues to oscillate at a lower frequency. This allowed to say that the oscillations of  $[Ca^{2+}]_i$  are not directly involved in the process of oscillations of insulin secretion but could intervene in its fine regulation.

**KEYWORDS:** Diabetes; Insulin; Calcium; PMCA;  $\beta$  cell.

**RESUME:** L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) représente un événement majeur dans le processus de la sécrétion d'insuline. Les Calcium ATPase de la Membrane Plasmique (PMCA) sont équipées d'une série d'isoformes qui peuvent être tissus spécifiques. Il a été suggéré qu'il pourrait exister une différence d'activité entre les isoformes et que certaines d'entre elles pourraient jouer un rôle fondamental dans le fonctionnement de la cellule  $\beta$ . Les PMCA sont régulées par la calmoduline (CaM), les phospholipides acides, les protéines kinases, les protéases, les protéines G et par oligomérisation. La CaM active la pompe et cet effet activateur va être limité par l'épissage alternatif au site C qui est leur domaine de fixation. Les phospholipides acides sont des stimulateurs de la PMCA. Mais, l'épissage alternatif au site A pourrait donc affecter la régulation des isoformes de la PMCA par les phospholipides en altérant l'accessibilité des phospholipides à leur domaine de fixation. A l'opposé, les PMCA sont inhibés par les ions lanthane et vanadate, par les antagonistes de la calmoduline, la N-Ethylmaleimide et Les dérivés de la fluorescéine. Cependant, Les expériences menés ont montré que la suppression des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  est accompagnée par une augmentation du métabolisme du glucose et de la sécrétion d'insuline qui continue à osciller mais avec une périodicité plus faible. Cela amène à dire que les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  ne sont pas directement impliquées dans le processus d'oscillations de la sécrétion d'insuline mais pourraient intervenir dans sa régulation fine.

**MOTS-CLEFS:** Diabète; Insuline; Calcium; PMCA; cellule  $\beta$ .

## 1 INTRODUCTION

La Calcium ATPase de la Membrane Plasmique (PMCA) fut découverte dans les années 60 dans les érythrocytes humains [1]. Elle appartient à la classe P des ATPases formant un intermédiaire phosphorylé (un aspartyl phosphate) au cours du cycle de la réaction [2]. Le cycle réactionnel (Figure 2) débute par la liaison à haute affinité de 2 ions  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmiques qui activent l'enzyme, lui permettant alors d'utiliser l'ATP comme source d'énergie. Un groupement phosphate de l'ATP est transféré au niveau de l'unité catalytique de l'enzyme générant la formation d'un intermédiaire phosphorylé. La phosphorylation de l'enzyme provoque un changement de conformation de la protéine et diminue son affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci entraîne la libération des cations dans le milieu extracellulaire. La phosphoenzyme subit ensuite un clivage hydrolytique et relargue le phosphate inorganique avant d'entrer dans un autre cycle. A l'état non stimulé, la PMCA a une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_m > 10 \mu\text{M}$ ). Par contre lorsqu'elle est stimulée par la calmoduline (CaM) ou les phospholipides acides, l'affinité augmente et le  $K_m$  chute de 10-50  $\mu\text{M}$  à environ 0.2-0.5  $\mu\text{M}$  [3].

## 2 REGULATION DE LA SECRETION D'INSULINE PAR LE CALCIUM

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) joue un rôle de second messenger intracellulaire important dans de nombreux processus physiologiques dont la sécrétion d'insuline (Figure 1). Lors de la stimulation de la cellule  $\beta$  pancréatique par le glucose, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) représente un événement majeur dans le processus de la sécrétion d'insuline [4-7]. Selon le schéma le plus communément admis, le métabolisme du glucose par la cellule  $\beta$  provoque une augmentation du taux d'ATP ou du rapport ATP/ADP qui entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants ( $K_{\text{ATP}}$ ). Ceci engendre une dépolarisation membranaire suivie d'une ouverture des canaux calciques sensibles au potentiel de membrane et un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. L'augmentation résultante de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) déclenche la translocation des granules d'insuline et l'exocytose [8].

Le concept selon lequel le  $\text{Ca}^{2+}_i$  sert de messenger secondaire dans la sécrétion d'insuline est largement accepté. Par ailleurs, depuis 1992, trois études indépendantes ont montré que la fermeture des canaux  $K_{\text{ATP}}$  de la membrane des cellules  $\beta$  ne constitue pas le seul mécanisme déclenchant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [9-11]. Une autre voie a été mise en évidence permettant la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation du métabolisme du glucose qui est appelée "voie indépendante des canaux  $K_{\text{ATP}}$ " ou voie amplificatrice. Selon cette dernière, une augmentation du rapport ATP/ADP est capable de stimuler la sécrétion d'insuline même lorsque les canaux ATP-dépendants sont fermés ou inactivés et ce pour autant que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  soit élevée au-dessus de la normale.

## 3 REGULATION DE L'EXOCYTOSE DES GRANULES D'INSULINE

Il a été établi que l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  déclenche la translocation des granules d'insuline et l'exocytose [8]. La cellule  $\beta$  contient des milliers de granules sécrétoires. L'analyse de la cinétique de l'exocytose dans une variété de cellules endocrines et de neurones a permis de proposer que les granules existent sous la forme de différents pools fonctionnels. En effet, en réponse à une élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , seulement 5% des granules existent sous une forme compétente pour la sécrétion, et sont capables de subir exocytose. Ce groupe de granules est appelé RRP ("Readily Releasable Pool") [12]. On croit qu'un sous groupe de granules RRP est situé aux alentours immédiats des canaux calciques voltage-dépendants, et sont ainsi rapidement exposés à un taux exocytotique de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'ouverture des canaux calciques. Ce sous groupe est appelé IRP ("Immediately Releasable Pool"). Les granules RRP et IRP sont connectées à la membrane plasmique via un complexe trans-SNARE ("soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF)-attachment protein (SNAP) receptor"). Pour le reste, la plus grande partie des granules de la cellule  $\beta$  (95%), existe donc sous forme d'un "pool de réserve" non sécrétable, et devant subir une série de réactions dépendantes de l'ATP, du  $\text{Ca}^{2+}$  et de la température pour devenir compétent pour la sécrétion [13]. Ces réactions sont collectivement appelées amorçage. La capacité des cellules à maintenir une réponse exocytotique à long terme dépend d'un réapprovisionnement continu en granules RRP par la mobilisation des granules du "pool de réserve", phénomène amorcé par l'ATP. Il a été proposé que la capture du  $\text{Cl}^-$  par les granules soit impliquée dans l'amorçage des granules sécrétoires pour l'exocytose [14]. Ceci suggère que cet amorçage dépend de l'acidification intragranulaire dans les cellules  $\beta$ . Cette dernière dépend quant à elle de l'activité simultanée de la  $\text{H}^+$ -ATPase de type V et de canaux  $\text{Cl}^-$  CIC-3 de la membrane du granule. Selon ce scénario, le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ATP accroissent la capture du  $\text{Cl}^-$  par les granules, facilitent le pompage de  $\text{H}^+$  et donc amorçage du granule. A l'inverse, l'ADP en inhibant le canal CIC-3, empêche l'acidification et l'amorçage des granules [12]. Donc l'acidification accroît la compétence sécrétoire des granules, et un pH bas pourrait promouvoir l'exocytose en induisant un changement conformationnel des protéines SNARE rendant ainsi les granules plus fusogéniques [15].

## 4 REGULATION DES ACTIVITES DES PMCAS

Les PMCA sont régulées par la CaM, les phospholipides acides, les protéines kinases, les protéases, les protéines G et par oligomérisation.

### 4.1 LA CALMODULINE

La CaM se fixe à une région du domaine COOH-terminal des PMCA située environ 40 résidus en aval du dernier domaine transmembranaire, et active la pompe par une augmentation de la  $V_{max}$  et de l'affinité pour le  $Ca^{2+}$  [16]. En absence de CaM (Figure 7), cette séquence constituée de 28 acides aminés agit comme un domaine "autoinhibiteur" en se fixant à 2 sites de la pompe, l'un localisé sur la deuxième boucle cytoplasmique (résidus 206-271, érythrocyte humain) et l'autre localisé sur la troisième (résidus 537-544, érythrocyte humain) [17-19]. En absence de CaM, le domaine autoinhibiteur COOH-terminal empêche le turnover catalytique, en maintenant la pompe dans un état inactif. Une augmentation du  $Ca^{2+}_i$  accroît l'affinité de la CaM pour son site de liaison, s'y fixe, et ce faisant supprime l'effet autoinhibiteur et stimule l'activité de la pompe à son potentiel maximum (Figure 8). La structure cristallographique de l'enzyme (protéine kinase I  $Ca^{2+}$ -CaM dépendante) dans son état autoinhibé a permis de montrer qu'en l'absence de CaM, le domaine COOH-terminal interagit avec différents sites du domaine catalytique, empêchant l'accès au substrat et la fixation de l'ATP [20]. Par ailleurs, l'épissage alternatif affecte l'affinité des PMCA pour le  $Ca^{2+}$  et la CaM, aussi bien que la  $V_{max}$  de la protéine active [21-24]. L'épissage alternatif au site C de la PMCA pourrait donc affecter la régulation et les propriétés d'interaction protéique des différents variants d'épissage avec la CaM. Il a été montré que le site C se trouve au milieu de la séquence d'acides aminés correspondant au domaine de fixation de la CaM et que la région juste en amont du site C est conservée dans les quatre isoformes de la PMCA [25;26]. L'insertion d'un exon au site C entraîne un changement de la phase ouverte de lecture de l'ADN codant pour l'extrémité COOH-terminale et a pour conséquence une réduction de l'affinité de la pompe pour la CaM [22;24]. L'activité basale est plus élevée dans le variant d'épissage 'a' que dans le 'b' [22;23;27]. Par ailleurs, l'isoforme PMCA2b possède une affinité pour la CaM qui est 5-10 fois plus élevée que celle de l'isoforme PMCA4b, ceci étant dû à des différences au sein des 10 derniers acides aminés du domaine de fixation de la CaM [23;28]. Les variants d'épissage a et b de la PMCA2 restent actifs à des concentrations de CaM très basses, de l'ordre du nanomolaire, et sont capables d'expulser le  $Ca^{2+}$  quand la  $[Ca^{2+}]_i$  est inférieure à 100 nM [21;23]. Ceci a conduit à la spéculation selon laquelle la PMCA2 pourrait être constitutivement exprimée et activée dans le cerveau, où elle est la plus abondante car la concentration cytosolique en CaM dans le cerveau peut être supérieure à 50  $\mu$ M [29].

### 4.2 LES PHOSPHOLIPIDES ACIDES

Les phospholipides acides, et en particuliers les polyphosphoinositides, sont de puissants stimulateurs de la PMCA [30-32]. Ils réduisent la constante de Michaelis de l'enzyme pour le  $Ca^{2+}$  à environ 0.3  $\mu$ M comparée à celle de la CaM (0.4-0.7  $\mu$ M). L'activation par les phospholipides acides rend donc les PMCA insensibles à l'activation par la CaM [16;33]. Le mécanisme par lequel les différents phospholipides acides activent les PMCA n'est pas encore connu. L'épissage alternatif au site A affecte la première boucle cytoplasmique dans la région située entre la séquence de fixation des phospholipides et la séquence impliquée dans l'interaction d'autoinhibition. L'épissage alternatif au site A pourrait donc affecter la régulation des isoformes de la PMCA par les phospholipides en altérant l'accessibilité des phospholipides à leur domaine de fixation. Les variants d'épissage ont montré différents niveaux d'autoinhibition liés à des différences structurelles au site A générées par une insertion de séquences variables.

### 4.3 LES PROTÉINES KINASES

Il a été montré que la région COOH-terminale des PMCA était la cible de phosphorylation de la protéine par les protéines kinases A et C [21;33-36].

#### LA PROTÉINE KINASE A (PKA)

La protéine kinase A phosphoryle une sérine située entre le COOH-terminal et le site de fixation de la CaM, conduisant à une augmentation de l'activité de la pompe [37]. Il a été montré que la PKA phosphoryle la ser-1178 de la hPMCA1b dans la séquence consensus KRNSS [37]. Une séquence comparable (KQNSS) a été trouvée uniquement dans la PMCA2b, suggérant que la phosphorylation par la PKA est réservée à un certain sous-groupe de PMCA.

#### 4.3.1 LA PROTÉINE KINASE C (PKC)

En général la stimulation par la PKC conduit à une augmentation de l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  par la PMCA. Il en résulte une augmentation de la vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ ) de la pompe mais pas de l'affinité pour le calcium ( $K_m$ ) [38]. La PKC phosphoryle la thr-1102 située sur le site de fixation de la CaM [39]. La phosphorylation par la PKC stimule partiellement la PMCA en réduisant l'autoinhibition du site de fixation de la CaM. Cependant, l'effet de la PKC et de la CaM s'additionnent pour lever l'autoinhibition et activer totalement la pompe [40]. La PKC peut également phosphoryler un résidu serine près de l'extrémité COOH-terminale [39]. Par contre, la phosphorylation par la PKC diminue lorsque la concentration de CaM augmente [39]. Les différentes isoformes et variants d'épissage de la PMCA sont régulés de façon différente par la PKC. Tandis que les PMCA2a, 3a, 4a, et 4b sont facilement phosphorylées par la PKC, les PMCA2b, 3b sont de mauvais substrats pour cette kinase [41].

#### 4.4 LES PROTÉASES

Les PMCA peuvent être clivées par la calpaine au niveau de plusieurs sites dans la protéine [33;34]. Un clivage de la seconde unité cytoplasmique de la PMCA permet à la protéine d'être active de façon permanente [42]. Le clivage de la protéine pourrait intervenir comme dernière ligne de défense de la cellule en cas d'apoptose induite par une augmentation excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  qui active la calpaine.

#### 4.5 LA PROTÉINE G

La séquence située immédiatement en aval du site A présente beaucoup de similarités avec un motif consensus du site de fixation de la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G trouvé dans une variété de canaux et de récepteurs membranaires [43]. Ceci suggère que les PMCA pourraient être régulées par les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  de la protéine G hétéromère [44-46]. L'épissage alternatif au site A pourrait donc avoir des conséquences importantes sur l'interaction protéine G-PMCA.

#### 4.6 L'OLIGOMÉRIISATION

Il a été montré que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique, purifiée à partir des érythrocytes humains, peut subir une activation par oligomérisation. Cette oligomérisation est réversible, dépend de la concentration de l'enzyme, et aussi du  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentration de l'enzyme et du  $\text{Ca}^{2+}$  affectent les proportions entre monomères et oligomères. On obtient un niveau maximal d'oligomérisation à une concentration de l'enzyme de l'ordre de 30 à 40 nM [47;48]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est absolument nécessaire pour l'activation de la PMCA soit par la CaM, soit par oligomérisation. La CaM active les monomères mais pas les oligomères, et aux concentrations faibles de l'enzyme, la disponibilité illimitée de CaM pourrait réduire sévèrement l'activation par oligomérisation [49]. L'activation de la PMCA par interaction des monomères avec la CaM ou par oligomérisation de l'enzyme peut se produire à des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  physiologiquement appropriées ( $K_{\text{Ca}^{2+}} \approx 50$  nM) [48;49]. L'oligomérisation se produit à des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  plus faibles ( $K_{\text{Ca}} = \text{pCa } 7.15$ ) que celles assurant l'activation de la calmoduline ( $K_{\text{Ca}} = \text{pCa } 6.6$ ), et la différence peut-être physiologiquement importante, sachant que l'oligomérisation peut se produire *in vivo* [48]. Par ailleurs, d'autres études supportent l'idée selon laquelle la PMCA existe en fait sous forme de dimère *in vivo* [50;51]. L'activation de la PMCA par la calmoduline ou par oligomérisation dépend des conditions environnementales, parmi lesquelles la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la disponibilité de la CaM, les protéases, les phospholipides ou la phosphorylation [32;52;53]. Cependant, une étude récente a permis de montrer que la forme activée de l'enzyme, indépendamment de la CaM, est un dimère, alors que la forme activée par la calmoduline est un complexe monomère-CaM [54]. Par ailleurs, l'activation de l'enzyme par dimérisation est un processus dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  [48]. En plus, la balance entre monomères et dimères, et la disponibilité de la CaM déterminent l'une ou l'autre voie d'activation [48]. L'affinité du monomère pour la CaM ( $K_d = 1.6\text{-}3.5$  nM) est plus élevée que l'affinité d'un monomère pour un autre ( $K_d = 8\text{-}15$  nM) [47;48]. Donc, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique est activable sous forme d'un complexe monomère-CaM ou sous forme de dimère.

## 5 LES INHIBITEURS DE L'ACTIVITE DES PMCAS

### 5.1 COMPOSÉS INORGANIQUES

#### 5.1.1 LANTHANE

L'ion  $\text{La}^{3+}$  est un inhibiteur des pompes calciques [55-57]. Le  $\text{La}^{3+}$  agit sur les faces interne et externe de la membrane cellulaire. Dans les membranes de globules rouges isolées, le  $\text{La}^{3+}$  inhibe la pompe avec un  $K_i$  de 2-3  $\mu\text{M}$  et semble être non compétitif par rapport au  $\text{Ca}^{2+}$  et à l'ATP. Il a été démontré que le  $\text{La}^{3+}$  agissait en bloquant la transition de la forme  $\text{E}_1\text{P}$  dépendant du  $\text{Mg}^{2+}$  [57].

#### 5.1.2 VANADATE

Le vanadium pentavalent ( $\text{VO}_3^-$ ) inhibe toutes les ATPases transporteuses de cations [58]. L'inhibition des pompes calciques par le vanadate a été étudiée dans les globules rouges [59-61], et dans les axones de calmar [62]. Le vanadate agit sur la face interne de la membrane plasmique. La concentration de vanadate requise pour 50 % de l'inhibition maximale est réduite par le  $\text{Mg}^{2+}$  intracellulaire et par le  $\text{K}^+$  en présence de  $\text{Mg}^{2+}$ . Le  $\text{Na}^+$  peut remplacer le  $\text{K}^+$ , ce qui n'est pas le cas du  $\text{Li}^+$  [61-62]. L'inhibition par le vanadate est levée pour des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire de l'ordre du millimolaire [61-62]. En fait, le vanadate bloque la transition  $\text{E}_2$  à  $\text{E}_1$ , comme déjà proposé pour l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase par ce même dérivé [63].

### 5.2 LES ANTAGONISTES DE LA CALMODULINE

Les pompes calciques peuvent opérer en l'absence de CaM. Donc, les drogues qui bloquent la CaM agissent uniquement comme inhibiteurs partiels de la pompe calcique. Les antagonistes de la CaM les plus utilisés sont la phénothiazine et en particulier la trifluoperazine [64]. Le calmidazolium [65] et le composé 48/80 [65-67] sont des inhibiteurs potentiels plus sélectifs de la CaM et sont, de ce fait, des antagonistes plus intéressants.

### 5.3 LES COMPOSÉS QUI RÉAGISSENT AVEC LES PROTÉINES

#### 5.3.1 N-ÉTHYLMALÉIMIDE (NEM)

Dans les globules rouges, la NEM inhibe les pompes calciques avec une plus grande affinité que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Cette inhibition est partiellement surmontée par l'addition d'ATP, de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Na}^+$ . Par contre l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$  renforce l'inhibition. L'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  est indépendant de l'ATP. C'est donc une preuve indirecte que la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  avec une grande affinité sur la pompe calcique est ATP-indépendante [68].

#### 5.3.2 LES DÉRIVÉS DE LA FLUORESCÉINE

Ces composés réagissent avec le site de fixation de l'ATP des pompes calciques [69]. Le FITC (Fluoresceine isothiocyanate) se fixe de façon non covalente à la protéine et inhibe complètement la PMCA dans les membranes de globules rouges, probablement en déplaçant l'ATP de son site en  $\text{E}_2$  durant le cycle de réaction (Figure 2). Le FITC inhibe également la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

## 6 CONTRIBUTION DES PMCAS A LA SECRETION D'INSULINE

Nous avons montré que la cellule  $\beta$  pancréatique était équipée de six isoformes qui sont les rPMCA1xb, 2yb, 2wb, 3za, 3zc, 4xb. Il a été suggéré qu'il pourrait exister une différence d'activité entre les isoformes et que certaines d'entre elles pourraient jouer un rôle fondamental dans le fonctionnement de la cellule  $\beta$  [70].

Il a été rapporté que, dans les cellules  $\beta$  de souris, le glucose génère des oscillations de grande amplitude de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui sont synchrones avec les oscillations de la sécrétion d'insuline. Dès lors, il a été suggéré que les oscillations de la sécrétion d'insuline étaient déterminées par les oscillations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [8;9]. Dans la cellule  $\beta$ , on considère que les augmentations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  résultent de l'ouverture intermittente des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants [6;10]. Par ailleurs, les oscillations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  résultent elles-mêmes d'oscillations du métabolisme du glucose [11;71]. Afin, d'examiner le rôle joué par le  $\text{Ca}^{2+}_i$  dans

le processus de sécrétion d'insuline, nous avons étudié l'effet de la surexpression de la PMCA sur les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  et de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. A cet effet, la PMCA2wb a été clonée à partir d'îlots pancréatiques de rat et une transfection stable a été réalisée sur les cellules insulaires BRIN-BD11 [72].

La surexpression a été établie sur le plan ARNm et protéique. Son ciblage à la membrane plasmique a été mis en évidence par immunofluorescence et par l'augmentation de l'activité de la PMCA.

En réponse à la stimulation par le  $K^+$ , on observe une inhibition importante de la hausse de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le  $K^+$  dans les cellules surexprimant la PMCA2wb par rapport au contrôle. En réponse au glucose, on observe dans les cellules contrôles des oscillations de  $[Ca^{2+}]_i$  de large amplitude, alors que dans les cellules transfectées avec la PMCA2wb, on observe une réduction de l'amplitude des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  (**Figure 2**). La suppression des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  est accompagnée par une augmentation du métabolisme du glucose et de la sécrétion d'insuline qui continue à osciller mais avec une périodicité plus faible (**Figure 3**).

En conclusion, les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  semblent ne pas être nécessaires pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose et pourraient être moins favorable qu'une augmentation stable de la  $[Ca^{2+}]_i$  pour une meilleure sécrétion d'insuline. Les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  ne sont pas directement impliquées dans le processus d'oscillations de la sécrétion d'insuline mais pourraient intervenir dans sa régulation fine.

## 7 DISCUSSION

Récemment, il a été suggéré que, dans la cellule  $\beta$ , les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  pourraient avoir divers avantages comparé à une augmentation soutenue de la  $[Ca^{2+}]_i$  [29]. En effet, un signal oscillatoire pourrait avoir l'avantage de prévenir la désensibilisation de la machinerie sécrétoire de la cellule  $\beta$  [29]. De même, les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$ , en déterminant une sécrétion pulsatile d'insuline de la cellule  $\beta$  pourraient prévenir une "down régulation" ou régulation négative de l'expression du nombre de récepteurs périphériques à l'insuline. Une telle "down régulation" pourrait à son tour accroître la quantité d'insuline devant être sécrétée, avec accroissement subséquent du travail de la cellule  $\beta$  et complications systémiques liées à une sécrétion excessive d'insuline. Enfin, un comportement oscillatoire de la  $[Ca^{2+}]_i$  permet d'éviter des élévations excessives et prolongées de cette  $[Ca^{2+}]_i$ , dont on sait qu'elles peuvent être toxiques pour la cellule  $\beta$  [29;73]. Récemment, une sécrétion oscillatoire d'insuline a été observée en présence d'une  $[Ca^{2+}]_i$  stable dans diverses conditions, à savoir à concentration faible (3 mM) et élevée (20 mM) de glucose, ou quand la membrane plasmique est dépolarisée par le  $K^+$  extracellulaire ou par le sulfamidé hypoglycémiant tolbutamide [74-76;1]. Dans ces dernières conditions, il a été proposé que la  $[Ca^{2+}]_i$  joue en fait un rôle permissif et que les oscillations de la sécrétion d'insuline sont déterminées directement par les oscillations du métabolisme du glucose [74-76;1]. Néanmoins, aux concentrations intermédiaires de glucose, situation dans laquelle on observe des oscillations synchrones de la  $[Ca^{2+}]_i$  et de la sécrétion d'insuline, il est considéré que les oscillations parallèles du métabolisme du glucose et de la  $[Ca^{2+}]_i$  concourent à la sécrétion pulsatile d'insuline [1].

Cependant, puisque le glucose peut stimuler la sécrétion pulsatile d'insuline en absence d'oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  à concentration faible ou élevée de glucose, on peut se demander si même aux concentrations intermédiaires de glucose, les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  ici évoquées sont indispensables à la sécrétion d'insuline. En effet, l'activité électrique en salve des îlots de souris concomitante des oscillations lentes de la  $[Ca^{2+}]_i$  est observée uniquement à des concentrations extracellulaires de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_o$ ) > 1 mM (1.5 mM pour l'activité électrique en salve [2] et 1.28 mM pour les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  [10] et disparaît à une  $[Ca^{2+}]_o$  de 1 mM [2] et 0.8 mM, respectivement [10]. Enfin, ces oscillations ne sont pas observées dans les îlots de rat, même à une  $[Ca^{2+}]_o$  élevée [3]. Par conséquent, on pourrait même se demander si les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$ , telles qu'observées chez la souris, ne pourraient pas être préjudiciable à la sécrétion d'insuline comparé à une augmentation stable de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En effet, par rapport à ce dernier comportement, un comportement oscillatoire comprend des périodes pendant lesquelles la  $[Ca^{2+}]_i$  atteint ou passe en dessous du niveau basal.

Notre étude a permis de montrer que la suppression des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  est accompagnée par une augmentation du métabolisme du glucose et de la sécrétion d'insuline qui continue à osciller mais avec une périodicité plus faible [72]. Donc Les oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$  ne sont pas directement impliquées dans le processus d'oscillations de la sécrétion d'insuline mais pourraient intervenir dans sa régulation fine.

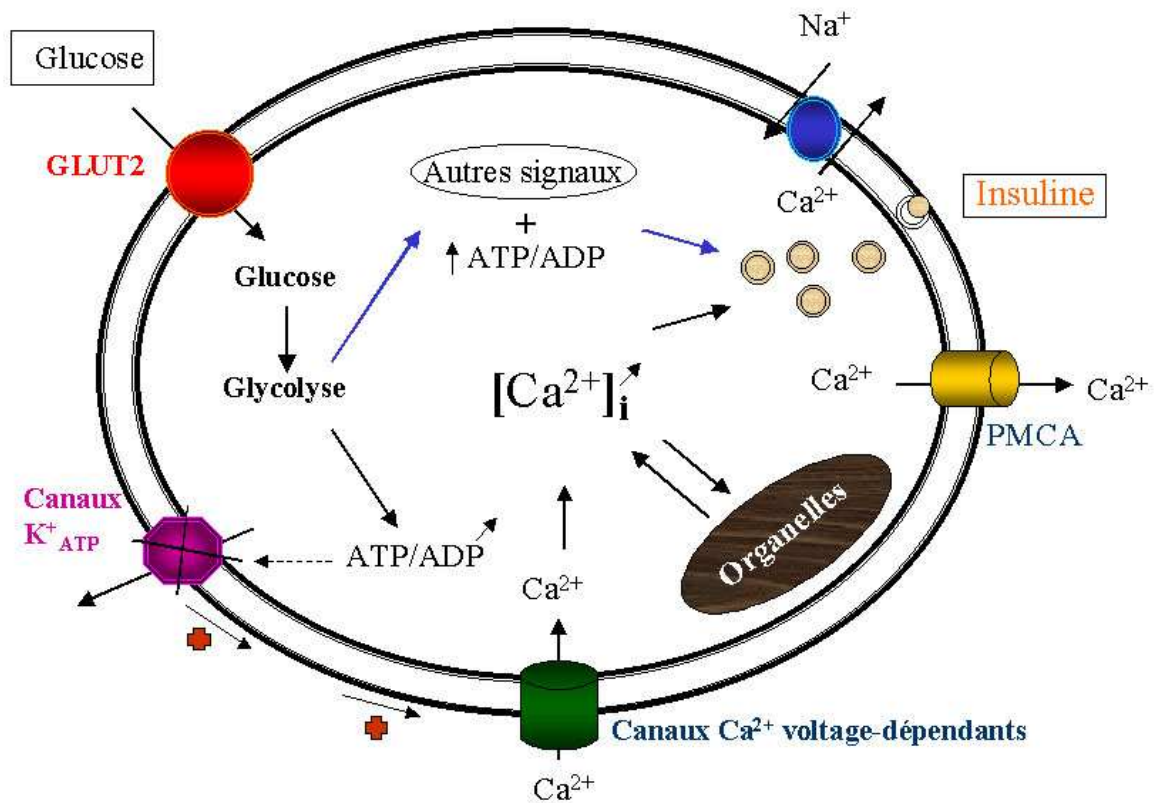
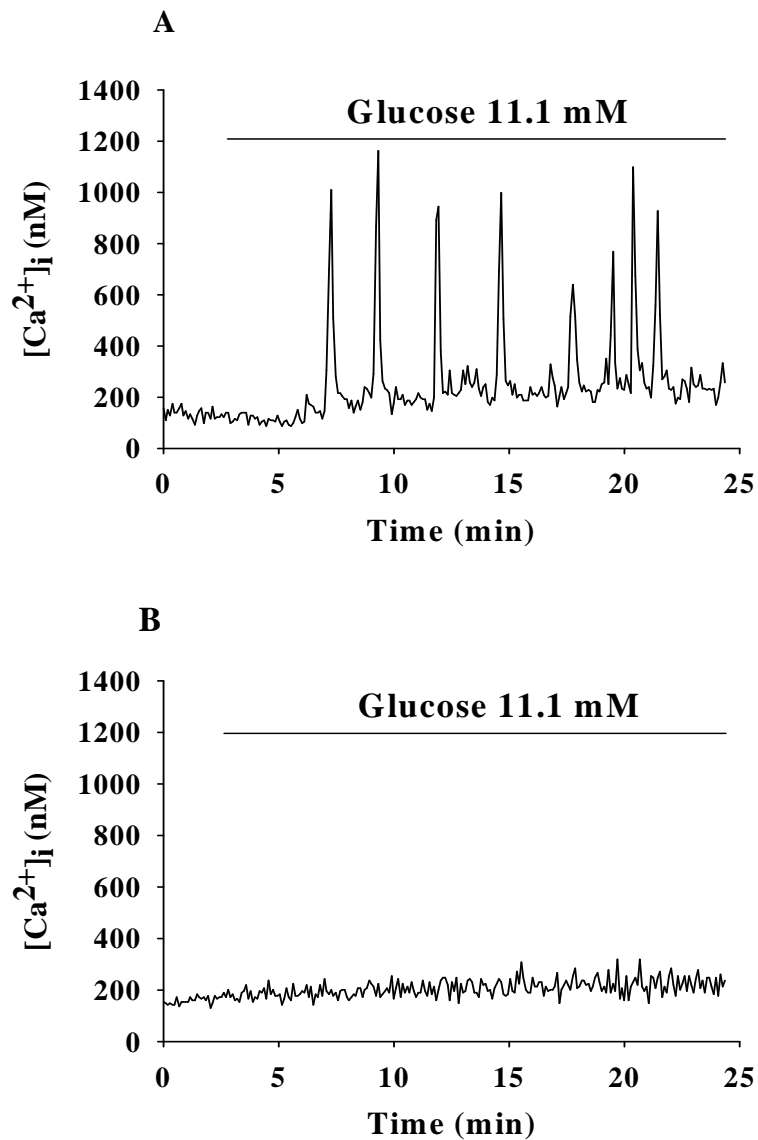


Figure 1 : Représentation schématique du processus de la sécrétion d'insuline par les voies dépendante et indépendante des canaux K<sub>ATP</sub>.

Le schéma montre l'entrée du glucose dans la cellule *via* le transporteur de glucose GLUT2, ainsi que son métabolisme qui aboutit à une augmentation du rapport ATP/ADP et à la fermeture des canaux K<sub>ATP</sub>. La fermeture des canaux K<sub>ATP</sub> conduit à une dépolarisation de la membrane, à l'ouverture des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants, à l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule et enfin à l'augmentation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Il s'ensuit alors une stimulation de la sécrétion d'insuline par exocytose (voie dépendante des canaux K<sub>ATP</sub>). Le métabolisme du glucose conduit par ailleurs à la génération d'autres signaux non encore connus qui stimulent la sécrétion d'insuline sans augmenter la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (voie indépendante des canaux K<sub>ATP</sub>). Les deux voies de sécrétion d'insuline travaillent en synergie.



Les panneaux A et B présentent des tracés individuels représentatifs des différents types de réponse au glucose des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Le glucose 1,1 mM, a été ajoutés d'abord, et après 2 min de le glucose 11,1 mM.



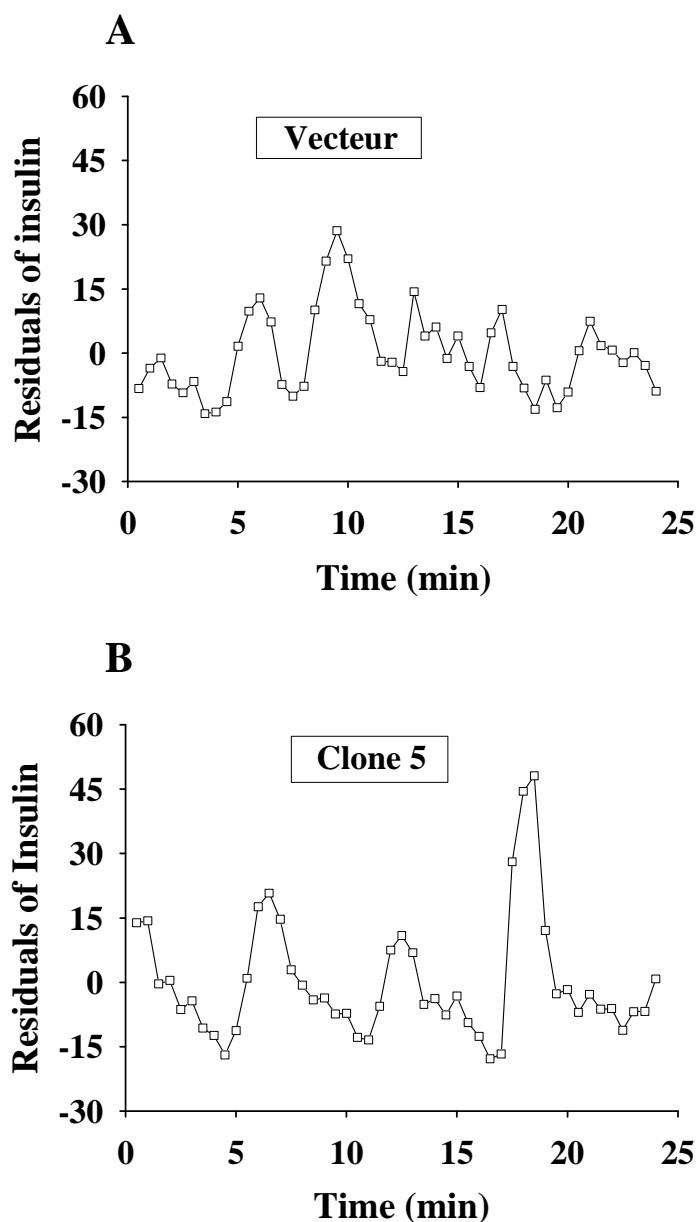


Figure 13: Le glucose induit une sécrétion pulsatile de l'insuline par des cellules BRIN-BD11 cultivées en plaques multipuits.

Libération d'insuline à partir de cellules BRIN-BD11 cultivées dans des plaques de 48 puits au cours du temps, montrent les oscillations de la sécrétion d'insuline avec une périodicité. Le Panneau A représente la cellule normale, alors que le panneau B représente la cellule qui surexprime la PMCA2.

## REFERENCES

- [1] H. J. Schatzmann, "ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -extrusion from human red cells", *Experientia*, vol. 22, pp. 364-365, 1966.
- [2] E. Carafoli, "The plasma membrane calcium pump. Structure, function, regulation", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1101, pp. 266-267, 1992.
- [3] E. Carafoli, "Molecular, mechanistic, and functional aspects of the plasma membrane calcium pump", *Prog. Clin. Biol Res.*, Vol. 168, pp. 13-17, 1984.
- [4] C. B. Wollheim, and G. W. Sharp, "Regulation of insulin release by calcium", *Physiol. Rev.*, vol. 61, pp. 914-973, 1981.
- [5] A. Herchuelz, and W. J. Malaisse, *Calcium and insulin release*, In : L. J. Anghileri and A. M. Tuffet-Anghileri (Eds), *The Role of Calcium in Biological Systems*, Boca Ratón: CRC press, pp. 17-32, 1982.
- [6] M. Prentki, and F. M. Matschinsky, " $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion", *Physiol. Rev.*, vol. 67, pp. 1185-1248, 1987.
- [7] B. Hellman, E. Gylfe, P. Bergsten, H. Johanson, and N. Wesslèn, *Glucose-induced modifications of the calcium movements regulating insulin and glucagon release*, In : V. Grill and S. Effendic (Eds), *Pathogenesis of Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*, New York: Raven Press, pp. 36-60, 1988.
- [8] S. I. Howell, *The biosynthesis and secretion of insulin*, In : J. Pickup and G. Williams (Eds), *Textbook of diabetes*, Blackwell Science Ltd, pp. 8.1-8.14, 1997.
- [9] M. Gembal, P. Gilon, and J. C. Henquin, "Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse B cells", *J. Clin. Invest.*, vol. 89, pp. 1288-1295, 1992.
- [10] Y. Sato, T. Aizawa, M. Komatsu, N. Okada, and T. Yamada, "Dual functional role of membrane depolarization/ $\text{Ca}^{2+}$  influx in rat pancreatic B-cell", *Diabetes*, vol. 41, pp. 438-443, 1992.
- [11] J. C. Henquin, "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose", *Diabetes*, vol.49, pp. 1751-1760, 2000.
- [12] S. Barg, L. Eliasson, E. Renstrom, and P. Rorsman, A "Subset of 50 Secretory Granules in Close Contact With L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels Accounts for First-Phase Insulin Secretion in Mouse beta-Cells", *Diabetes*, vol. 51 Suppl 1, pp. S74-S82, 2002.
- [13] T. D. Parsons, J. R. Coorssen, H. Horstmann, and W. Almers, "Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells", *Neuron*, vol. 15, pp. 1085-1096, 1995.
- [14] S. Barg, P. Huang, L. Eliasson, D.J. Nelson, S. Obermuller, P. Rorsman, F. Thevenod, and E. Renstrom, "Priming of insulin granules for exocytosis by granular  $\text{Cl}^-$  uptake and acidification", *J. Cell Sci.*, vol. 114, pp. 2145-2154, 2001.
- [15] R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, and A. T. Brunger, "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution", *Nature*, vol. 395, pp. 347-353, 1998.
- [16] A. Enyedi, M. Flura, B. Sarkadi, G. Gardos, and E. Carafoli, "The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently" *J. Biol. Chem.*, Vol. 262, pp. 6425-6430, 1987.
- [17] A. Enyedi, T. Vorherr, P. James, D.J. McCormick, A. G. Filoteo, E. Carafoli, and J. T. Penniston, "The calmodulin binding domain of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump", *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, pp. 12313-12321, 1989.
- [18] R. Falchetto, T. Vorherr, J. Brunner, and E. Carafoli, "The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain", *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, pp. 2930-2936, 1991.
- [19] R. Falchetto, T. Vorherr, and E. Carafoli, "The calmodulin-binding site of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump interacts with the transduction domain of the enzyme", *Protein Sci.*, vol. 1, pp. 1613-1621, 1992.
- [20] J. Goldberg, A. C. Nairn, and J. Kuriyan, "Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I", *Cell*, vol. 84, pp. 875-887, 1996.
- [21] J. T. Penniston, and A. Enyedi, "Modulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump" *J. Membr. Biol.*, Vol. 165, pp. 101-109, 1998.
- [22] B. S. Preiano, D. Guerini, and E. Carafoli, "Expression and functional characterization of isoforms 4 of the plasma membrane calcium pump", *Biochemistry*, vol. 35, pp. 7946-7953, 1996.
- [23] N. L. Elwess, A. G. Filoteo, A. Enyedi, and J. T. Penniston, "Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$ ", *J. Biol. Chem.*, Vol. 272, pp. 17981-17986, 1997.
- [24] A. Enyedi, A. K. Verma, R. Heim, H. P. Adamo, A. G. Filoteo, E. E., Strehler, and J. T. Penniston, "The  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump is controlled by alternative splicing", *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, pp. 41-43, 1994.
- [25] P. James, M. Maeda, R. Fischer, A. K. Verma, J. Krebs, J. T. Penniston, and E. Carafoli, "Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of human erythrocytes", *J. Biol. Chem.* vol., 263, pp. 2905-2910, 1988.
- [26] A. K. Verma, A. G. Filoteo, D. R. Stanford, E. D. Wieben, J. T. Penniston, E. E., Strehler, R. Fischer, R. Heim, G. Vogel, and S. Mathews, "Complete primary structure of a human plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump" *J. Biol. Chem.*, vol. 263, pp. 14152-14159, 1988.

- [27] A. K. Verma, A. Enyedi, A. G., Filoteo, E. E. Strehler, and J. T. Penniston, "Plasma membrane calcium pump isoform 4a has a longer calmodulin-binding domain than 4b", *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 3714-3718, 1996.
- [28] H. Hilfiker, D. Guerini, and E. Carafoli, "Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Functional properties of the enzyme and its splicing products", *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 26178-26183, 1994.
- [29] E. Carafoli, "Intracellular calcium homeostasis" *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 56, pp. 395-433, 1987.
- [30] L. Missiaen, L. Raeymaekers, F. Wuytack, M. Vrolix, H. de Smedt, and R. Casteels, "Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference", *Biochem. J.*, vol. 263, pp. 687-694, 1989.
- [31] V. Niggli, E. S. Adunyah, and E. Carafoli, "Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase", *J. Biol. Chem.*, vol. 256, pp. 8588-8592, 1981.
- [32] V. Niggli, E. S. Adunyah, J. T. Penniston, and E. Carafoli, "Purified ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids" *J. Biol. Chem.*, vol. 256, pp. 395-401, 1981.
- [33] K. K. W. Wang, A. Villalobo, and B. D. Roufogalis, "The plasma membrane calcium pump : a multiregulated transporter", *Trends Cell Biol.*, Vol. 2, pp. 22-27, 1992.
- [34] E. Carafoli, "Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme", *FASEB J.*, vol. 8, pp. 993-1002, 1994.
- [35] Monteith, G. R. and Roufogalis, B.D. "The plasma membrane calcium pump--a physiological perspective on its regulation", *Cell Calcium*, vol. 18, pp. 459-470, 1995.
- [36] F. Wuytack, and L. Raeymaekers, "The  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPases from the plasma membrane" *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 24, pp. 285-300, 1992.
- [37] P. H. James, M., Pruschy, T. E. Vorherr, J. T. Penniston, and E. E. Carafoli, Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry*, vol. 28, pp. 4253-4258, 1989.
- [38] K. Furukawa, Y. Tawada, and M. Shigekawa, "Protein kinase C activation stimulates plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump in cultured vascular smooth muscle cells" *J. Biol. Chem.*, vol. 264, pp. 4844-4849, 1989.
- [39] K. K., Wang, L. C. Wright, C. L. Machan, B. G., Allen, A. D. Conigrave, and B. D. Roufogalis, "Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human erythrocytes" *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pp. 9078-9085, 1991.
- [40] J. I. Smallwood, B. Gugi, and H. Rasmussen, "Regulation of erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  pump activity by protein kinase C", *J. Biol. Chem.*, vol. 263, pp. 2195-2202, 1988.
- [41] A. Enyedi, N. L. Elwess, A. G. Filoteo, A. K. Verma, K. Paszty, and J. T. Penniston, "Protein kinase C phosphorylates the "a" forms of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoforms 2 and 3 and prevents binding of calmodulin", *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 27525-27528, 1997.
- [42] K. K. Wang, B. D. Roufogalis, and A. Villalobo, "Calpain I activates  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the reconstituted erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  pump", *J. Membr. Biol.*, vol. 112, pp. 233-245, 1989.
- [43] J. Chen, M. DeVivo, J. Dingus, A. Harry, J. Li, J. Sui, D. J. Carty, J. L. Blank, J.H. Exton, and R. H. Stoffel, "A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits" *Science*, vol. 268, pp. 1166-1169, 1995.
- [44] C. Jouneaux, Y. Audigier, P. Goldsmith, F. Pecker, and S. Lotersztajn, "Gs mediates hormonal inhibition of the calcium pump in liver plasma membranes", *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 2368-2372, 1993.
- [45] C. Jouneaux, A. Mallat, G. C. Serradeil-Le, P. Goldsmith, J. Hanoune, and S. Lotersztajn, "Coupling of endothelin B receptors to the calcium pump and phospholipase C via Gs and Gq in rat liver", *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 1845-1851, 1994.
- [46] S. Lotersztajn, C. Pavoine, P. Deterre, J. Capeau, A. Mallat, D. LeNguyen, M. Dufour, B. Rouot, D. Bataille, and F. Pecker, "Role of G protein beta gamma subunits in the regulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump", *J. Biol. Chem.*, vol. 267, pp. 2375-2379, 1992.
- [47] D. Kosk-Kosicka, and T. Bzdega, "Activation of the erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by either self-association or interaction with calmodulin" *J. Biol. Chem.*, vol. 263, pp. 18184-18189, 1988.
- [48] D. Kosk-Kosicka, T. Bzdega, and A. Wawrzynow, "Fluorescence energy transfer studies of purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated activation by oligomerization" *J. Biol. Chem.*, vol. 264, pp. 19495-19499, 1989.
- [49] D. Kosk-Kosicka, and T. Bzdega, "Effects of calmodulin on erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activation and oligomerization" *Biochemistry*, vol. 29, pp. 3772-3777, 1990.
- [50] L. Hymel, M. Nielsen, and K. Gietzen, "Target sizes of human erythrocyte membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities in the presence and absence of calmodulin" *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 815, pp. 461-467, 1985.
- [51] A. M. Minocherhomjee, G. Beauregard, M. Potier, and B.D. Roufogalis, "The molecular weight of the calcium-transport-ATPase of the human red blood cell determined by radiation inactivation" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 116, pp. 895-900, 1983.

- [52] L. Neyses, L. Reinlib, and E. Carafoli, "Phosphorylation of the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the cAMP-dependent protein kinase", *J. Biol. Chem.*, vol. 260, pp. 10283-10287, 1985.
- [53] R. D. Taverna, and D. J. Hanahan, "Modulation of human erythrocyte Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPase activity by phospholipase A2 and proteases. A comparison with calmodulin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 94, pp. 652-659, 1980.
- [54] D. L. Sackett, and D. Kosk-Kosicka, "The active species of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase are a dimer and a monomer-calmodulin complex" *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 9987-9991, 1996.
- [55] E. E. Quist, and B. D. Roufogalis, "Determination of the stoichiometry of the calcium pump in human erythrocytes using lanthanum as a selective inhibitor" *FEBS Lett.*, vol. 50, pp. 135-139, 1975.
- [56] J. P. Rossi, P. J. Garrahan, and A. F. Rega, "Reversal of the calcium pump in human red cells", *J. Membr. Biol.*, vol. 44; pp. 37-46, 1978.
- [57] S. Luterbacher, and H. J. Schatzmann, "The site of action of La<sup>3+</sup> in the reaction cycle of the human red cell membrane Ca<sup>2+</sup>-pump ATPase" *Experientia*, 39, pp. 311-312, 1983.
- [58] P. L. Pedersen, and E. Carafoli, "Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function", *TIBS*, vol. 12, pp. 156-150, 1987.
- [59] G. H. Bond, and P. M. Hudgins, "Inhibition of red cell Ca<sup>2+</sup>-ATPase by vanadate", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 600, pp. 781-790, 1980.
- [60] H. Barrabin, P. J. Garrahan, and A.F. Rega, "Vanadate inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human red cell membranes" *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 600, pp. 796-804, 1980.
- [61] J. P. Rossi, P. J. Garrahan, and A. F. Rega, "Vanadate inhibition of active Ca<sup>2+</sup> transport across human red cell membranes", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 648, pp. 145-150, 1981.
- [62] R. DiPolo, and L. Beauge, "The effects of vanadate on calcium transport in dialyzed squid axons. Sidedness of vanadate-cation interactions", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 645, pp. 229-236, 1981.
- [63] S. J. Karlish, L. A. Beauge, and I. M. Glynn, "Vanadate inhibits (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase by blocking a conformational change of the unphosphorylated form", *Nature*, vol. 282, pp. 333-335, 1979.
- [64] A.F. Rega, and P.J. Garrahan, "The Ca<sup>2+</sup> pump of plasma membranes. Boca Ratón, FL: CRC Press Inc, 1986.
- [65] K. Gietzen, "Comparison of the calmodulin antagonists compound 48/80 and calmidazolium", *Biochem. J.*, vol. 216, pp. 611-616, 1983.
- [66] J. P. Rossi, A. F. Rega, and P. J. Garrahan, "Compound 48/80 and calmodulin modify the interaction of ATP with the (Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)-ATPase of red cell membranes", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 816, pp. 379-386, 1985.
- [67] J. P. Rossi, P. J. Garrahan, and A. F. Rega, "Differential effects of compound 48/80 on the ATPase and phosphatase activities of the Ca<sup>2+</sup> pump of red cells", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 902, pp. 101-108, 1987.
- [68] D. E. Richards, A. F. Rega, and P. J. Garrahan, "ATPase and phosphatase activities from human red cell membranes: I. The effects of N-ethylmaleimide", *J. Membr. Biol.*, vol. 35, pp. 113-124, 1977.
- [69] H. Mugica, A. F. Rega, and P. J. Garrahan, "The inhibition of the calcium dependent ATPase from human red cells by erythrosin B", *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, vol. 34, pp. 163-173, 1984.
- [70] A. Kamagate, A. Herchuelz, A. Bollen, and F. Van Eylen, "Expression of multiple plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases in rat pancreatic islet cells", *Cell Calcium*, vol. 27, pp. 231-246, 2000.
- [71] B. F. Trump, and I. K. Berezsky, "The role of altered [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1313, pp. 173-178, 1996.
- [72] A. Kamagate, A. Herchuelz, and F. Van Eylen, "Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase overexpression reduces Ca<sup>2+</sup> oscillations and increases insulin release induced by glucose in insulin secreting BRIN-BD11 cells", *Diabetes*, vol. 51, pp. 2773-2788, 2002.
- [73] R. J. Miller, "The control of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis", *Prog. Neurobiol.*, vol. 37, pp. 255-285, 1991.
- [74] M. P. Blaustein, W. F. Goldman, G. Fontana, B. K. Krueger, E. M. Santiago, T. D. Steele, D. N. Weiss, and P. J. Yarowsky, "Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 639, pp. 254-274, 1991.
- [75] E. Carafoli, "Membrane transport of calcium: an overview", *Methods Enzymol.*, vol. 157, pp. 3-11, 1988.
- [76] E. Carafoli, "Calcium pump of the plasma membrane", *Physiol. Rev.*, vol. 71, pp. 129-153, 1991.