

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ès-SCIENCES

par

Christiane GOBLET

Chargée de Recherche au C.N.R.S.



LES MECANISMES DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Etude sur la fibre musculaire du Crabe

Carcinus mænas



Soutenue le 28 Avril 1986 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

M. ASHLEY,	Professeur à l'Université d'Oxford
M. GILLIS,	Professeur à l'Université de Louvain
M. MONTREUIL,	Professeur à l'Université de Lille I
Mme MOUNIER-BEDOURA,	Professeur à l'Université de Lille I
M. RAYMOND,	Chargé de Recherche au C.N.R.S.
M. ROUGIER,	Professeur à l'Université de Lyon I
Mme VENTURA-CLAPIER,	Chargée de Recherche au C.N.R.S.

Travail réalisé au Laboratoire de Physiologie des Structures Contractiles,
de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.

U.A. C.N.R.S. n° 308

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
HISTORIQUE	p. 5
I - ROLE DU CALCIUM DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	p. 8
II - STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE STRIE DE CRUSTACES	p. 9
III - ORIGINE ET STOCKAGE DU CALCIUM INTRAMUSCULAIRE	p. 26
IV - DEVELOPPEMENT DE LA FORCE MUSCULAIRE PAR LES PROTEINES CONTRACTILES	p. 50
V - STRUCTURE, SITES ET MODES D'ACTION DE LA CAFEINE	p. 56
MATERIEL ET METHODES	p. 59
I - MATERIEL BIOLOGIQUE	p. 63
II - MATERIEL DE MESURE ET D'ENREGISTREMENT	p. 73
III - SOLUTIONS	p. 88
IV - LECTURE DES TRACES	p. 103

RESULTATS

p. 107

RELATION ENTRE L'ACTIVITE ELECTRIQUE MEMBRANAIRE ET L'ACTIVITE MECANIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES DE CRABE

P. 115

I - ETUDE DES COMPOSANTES DE TENSION EN RELATION AVEC LE DEGRE D'EXCITABILITE

p. 115

II - ETUDE DE LA CONTRACTION PHASIQUE

p. 117

III - ETUDE DE LA COMPOSANTE TONIQUE

p. 121

IV - APPROCHE DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

p. 122

CARACTERISTIQUES GENERALES OBTENUES SUR LES FIBRES MUSCULAIRES PELEES

P. 131

I - FONCTIONNEMENT DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE

p. 131

II - LES PROTEINES CONTRACTILES

p. 145

MISE EN EVIDENCE D'UN LARGAGE CALCIQUE INDUIT PAR DES CATIONS DIVALENTS.

p. 157

I - ROLE DU CALCIUM

p. 157

II - ROLE DU STRONTIUM

p. 167

ROLE DE L'ADP DANS LE MECANISME DE LIBERATION CALCIQUE ET MISE EN EVIDENCE D'UN EFFET SPECIFIQUE SUR LE RS	p. 177
I - LIBERATION CALCIQUE INDUITE PAR L'ADP	p. 177
II - CONTROLES EXPERIMENTAUX	p. 181
III - CONCLUSION	p. 188
EFFETS DES INHIBITEURS POTASSIQUES SUR LES PROTEINES CONTRACTILES ET LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE	p. 189
I - LE TETRAETHYLAMMONIUM	p. 189
II - LA 4-AMINOPYRIDINE	p. 226
DISCUSSION	p. 237
CONCLUSION	p. 283
BIBLIOGRAPHIE	p. 287

INTRODUCTION

La contraction musculaire est le résultat d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire ($[Ca]_i$) et la relaxation le résultat du retour de $[Ca]_i$ au niveau de repos.

Selon les structures contractiles étudiées, l'augmentation de $[Ca]_i$ est due soit uniquement au flux entrant d'ions calcium soit uniquement au largage de calcium par une structure intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique (RS), soit aux deux.

Sur les fibres musculaires de Crabe, un influx d'ions calcium est absolument nécessaire au développement d'une contraction, qu'il soit sous la forme du courant entrant d'ions Ca, I_{Ca} (SUAREZ - KURTZ et coll., 1972; ATWATER et coll., 1974; GOBLET, 1979; GOBLET et MOUNIER, 1982) ou d'un influx calcique lié à l'efflux sodique de l'échange Na - Ca (GOBLET, 1979; GOBLET et MOUNIER, 1982). Cependant, cette petite quantité de calcium entrant, bien qu'essentielle, semble insuffisante pour produire l'activation du système contractile (CAPUTO et DIPOLLO, 1978; GOBLET et MOUNIER, 1982).

Depuis les études de COSTANTIN et coll. (1964) et WINEGRAD (1968), il est connu qu'une structure intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique, est une zone de stockage de calcium. En effet, la concentration calcique

intraréticulaire est proche de 0.5 à 2mM et les citernes terminales du RS contiennent 90% de cette quantité (HASSELBACH et OETLIKER, 1983). De plus, la membrane du RS présente deux propriétés: i) d'augmenter considérablement, sous certaines conditions, sa perméabilité calcique induisant ainsi un largage massif de Ca dans le myoplasme (JÓBSIS et O'CONNOR, 1966; RIDGWAY et ASHLEY, 1967; ASHLEY et RIDGWAY, 1970), ii) de capter le Ca situé dans le myoplasme et de l'accumuler (HASSELBACH et MAKINOSE, 1961; EBASHI et LIPMAN, 1962).

Le réticulum sarcoplasmique joue donc un rôle de tout premier plan dans le couplage excitation - contraction, mais le mécanisme par lequel s'effectue la libération du calcium stocké dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique est très controversé. En effet, plusieurs hypothèses existent:

- la libération du calcium est due à la dépolarisation de la membrane du RS. Ce mécanisme est appelé "Depolarization - induced calcium release" (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967; KASAI et MIYAMOTO, 1976).

- l'influx calcique créé par la dépolarisation membranaire de surface induit une libération du calcium sequestré dans le RS. Ce mécanisme est appelé "Calcium - induced calcium release" (FORD et PODOLSKY, 1968; FABIATO et FABIATO, 1975; SAIDA, 1982).

- la libération du calcium est la conséquence de l'inversion du fonctionnement de l'ATPase calcique du RS (TAKENAKA et coll., 1982).

- le largage calcique est dû à la formation d'un canal calcique par l'association de plusieurs ATPases sous l'influence des ions Ca (CHIESI, 1984).

- des changements de pression osmotique de part et d'autre de la

membrane du RS augmentent la perméabilité calcique (MEISSNER et MCKINLEY, 1976).

-le réticulum sarcoplasmique est un compartiment extracellulaire (PAGE et PAGE, 1968; BIRKS et DAVEY, 1969).

La nature de mon travail a consisté à déterminer, sur les fibres musculaires du crabe Carcinus maenas, le mécanisme permettant le largage calcique à partir du RS. De plus, des informations concernant la capture du calcium par le RS et la fixation du calcium sur les protéines contractiles, ont été obtenues.

HISTORICAL

I - ROLE DU CALCIUM DANS LE COUPLAGE EXCITATION - CONTRACTION.

II - STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE STRIE DE CRUSTACES.

A - Structure du muscle.

B - Ultrastructure de la fibre musculaire.

1 - Le système membranaire.

a - Les invaginations sarcolemmiques: les clefts.

b - Le système tubulaire.

c - Le réticulum sarcoplasmique.

2 - Les protéines contractiles.

a - Description classique d'une fibre musculaire striée squelettique.

b - Description d'une fibre musculaire de Crustacés.

III - ORIGINE ET STOCKAGE DU CALCIUM INTRAMUSCULAIRE.

A - Contrôle de la contraction par les ions calcium.

B - Mécanismes d'augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

1 - Influence de la concentration calcique extracellulaire.

a - Rôle du courant entrant calcique.

b - Rôle de l'échange sodium - calcium.

2 - Libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique.

a - Mécanisme de "depolarization - induced Ca release".

b - Mécanisme de "calcium - induced calcium release".

c - Le largage calcique en relation avec la protéine responsable de la capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique.

d - Relation entre le mécanisme de "Ca - induced Ca release" et le mécanisme faisant intervenir la pompe Ca - ATPase.

e - Autres hypothèses.

C - Stockage du calcium par le réticulum sarcoplasmique: mécanisme de diminution de la concentration calcique intracellulaire.

1 - Structure de l'ATPase.

2 - La fraction lipidique membranaire.

3 - La calséquestrine.

4 - Fonctionnement de l'ATPase calcique.

IV - DEVELOPPEMENT DE LA FORCE MUSCULAIRE PAR LES PROTEINES CONTRACTILES.

A - Fixation du calcium sur la troponine C.

1 - Affinité des sites pour le calcium.

2 - Facteurs influençant l'affinité des sites calciques.

B - Développement de la force musculaire par la création des ponts.

C - Activité ATPasique de la myosine.

V - STRUCTURE, SITES ET MODES D'ACTION DE LA CAFEINE.

I - ROLE DU CALCIUM DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

GALVANI (1791) a été le premier à observer qu'une stimulation électrique du muscle est capable de provoquer sa contraction. On sait, à présent, que la contraction musculaire est déclenchée *in vivo* par l'influx nerveux qui dépolarise la membrane cellulaire des fibres musculaires. Dès lors, comprendre le phénomène du couplage excitation-contraction correspond à déterminer les mécanismes intervenant entre la dépolarisation membranaire induite par une stimulation électrique prenant la forme d'un potentiel d'action (excitation) et la contraction. Aujourd'hui, grâce aux travaux de HEILBRUNN et WIERCINSKY (1947) il est admis que pour tous les muscles, le processus contractile est contrôlé par les ions calcium (Ca^{++}).

L'ensemble de la bibliographie nous permet de définir quatre étapes successives pour le couplage excitation-contraction.

- 1 - La membrane musculaire de surface est excitée. Elle modifie sa polarité normale de repos et est le siège d'une activité électrique appelée potentiel d'action. Celui-ci se propage vers le centre de la fibre le long des membranes du système tubulaire. Un potentiel d'action dit tubulaire apparaît.
- 2 - Le potentiel d'action tubulaire entraîne, par l'intermédiaire des diades ou triades, une libération du calcium accumulé dans les citernes du réticulum sarcoplasmique.

- 3 - La contraction est déclenchée par les ions calcium qui se fixent sur la troponine supprimant son effet inhibiteur sur le couple actine-myosine.
- 4 - Le relâchement commence lorsque le calcium est repompé par le réticulum, et en raison de la diminution de sa concentration dans le cytoplasme, le complexe calcium-troponine est dissocié.

Ces quelques données mettent en évidence les différents niveaux membranaires servant de voies de passage au calcium nécessaire au développement de la contraction musculaire. Nous allons, avant de les étudier de façon détaillée, effectuer une rapide revue des structures membranaires elles-mêmes et des acteurs de la contraction : les myofibrilles. Nous nous attacherons dans cette partie descriptive à montrer les particularités des fibres musculaires de Crustacés.

II - STRUCTURE ET ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE STRIE DE CRUSTACES

Les structures musculaires sont classiquement répertoriées en trois catégories : i) les fibres musculaires striées squelettiques, ii) les cellules musculaires cardiaques, iii) les fibres musculaires lisses. Très souvent, les fibres musculaires striées de Crustacés sont assimilées aux fibres musculaires striées squelettiques. Pourtant, une étude approfondie de la bibliographie montre des différences importantes dans l'organisation du muscle ainsi que dans l'organisation ultrastructurale.

BU
VILLEBU
VILLE

Figure 1 : Coupe transversale d'une fibre musculaire du crabe Carcinus montrant l'importance des invaginations du sarcolemme ou clefts. Le système tubulaire n'est pas visible à ce grossissement.

Microscopie optique. Echelle non précisée.

(D'après SELVERSTON, 1967).

A - Structure du muscle

Un muscle locomoteur de Crustacés consiste en une série de fibres bien individualisées ayant un point d'insertion sur la carapace et un second point d'insertion sur un axostyle commun. La forte cohésion anatomique des fibres musculaires qui fait l'unité du muscle chez les Vertébrés n'existe pas chez les Crustacés. La fibre musculaire de Crustacés est donc une structure anatomiquement bien individualisée. De plus, elle présente souvent un diamètre important et est parfois qualifiée de géante. En effet, alors que les fibres musculaires de Vertébrés ne dépassent guère 100 μm de diamètre, les fibres de Carcinus maenas atteignent couramment 350 μm . Le crabe Paralithoïdes présente des fibres de 4 mm de diamètre.

B - Ultrastructure de la fibre musculaire

Les composantes caractéristiques de la fibre musculaire sont le système membranaire et les protéines contractiles.

1 - Le système membranaire

L'utilisation d'un nouveau fixateur en microscopie électronique : le glutaraldéhyde a permis de mettre en évidence la structure membranaire fine du muscle de crabe (PEACHEY, 1967).

On distingue trois structures membranaires : les invaginations sarcolemmiques appelées "clefts", le système tubulaire et le réticulum sarcoplasmique.

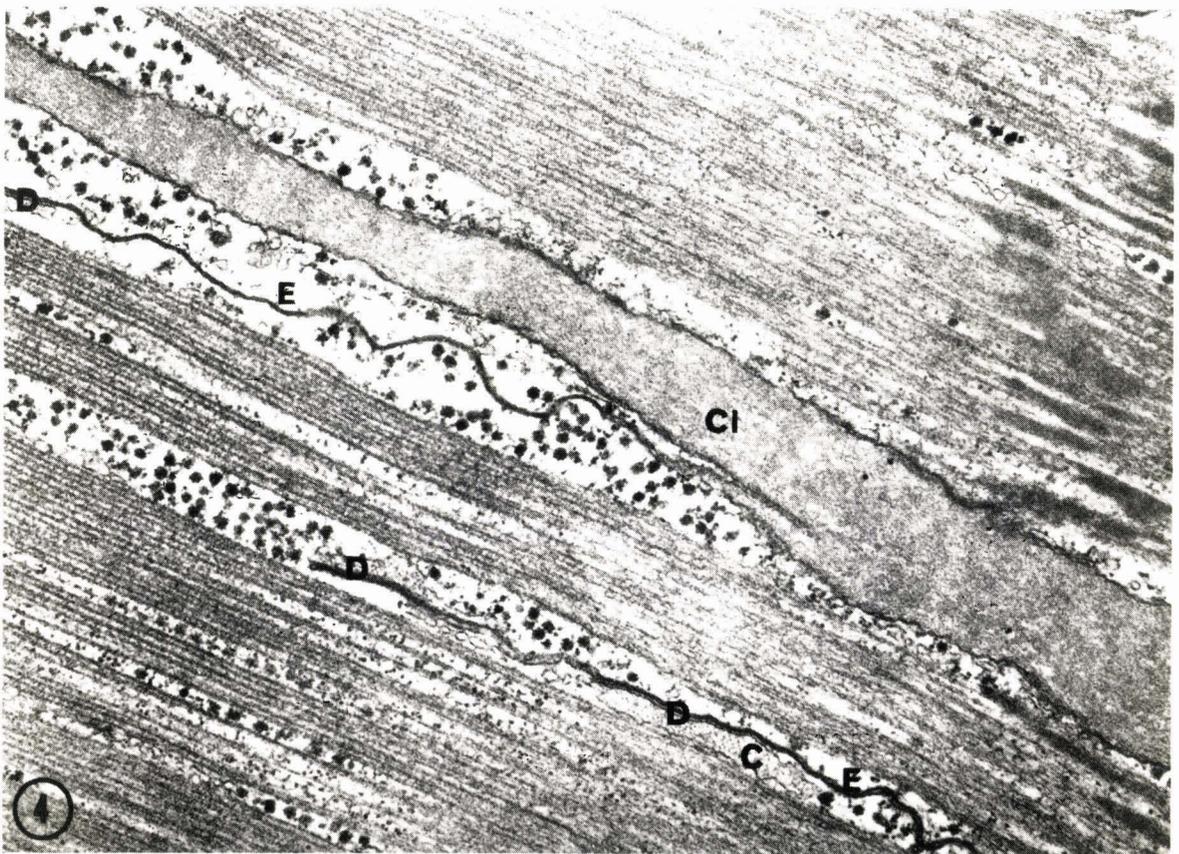


Figure 2 : Coupe longitudinale de fibre musculaire géante de Balane (*Balanus nubilus*) mettant en évidence les relations entre les trois systèmes membranaires.

Un tubule excitateur (E) émanant d'une cleft (C1) s'insère longitudinalement entre les myofibrilles et établit des contacts diadiques (D) avec les citernes (C) du réticulum sarcoplasmique.

Les particules observées entre les myofibrilles et dans les espaces entre les myofilaments même sont des grains de glycogène.

Microscopie électronique X 24000.

(D'après HOYLE et coll., 1973).

a - Les invaginations sarcolemmiques ("les clefts")

(Fig. 1 et 2).

Des études effectuées en microscopie optique et électronique ont montré l'existence d'un système d'invaginations membranaires profondes, ramifiées et accompagnées de la couche basale de surface. Ce système a été mis en évidence sur les fibres musculaires du crabe Carcinus sp (PEACHEY et HUXLEY, 1964 ; SELVERSTON, 1967), sur les fibres musculaires d'Ecrevisse (BRANDT et coll., 1965) et sur les fibres musculaires de balane Balanus nubilus (HOYLE et coll., 1973). Ces clefts en forme de ruban, s'ouvrent à la périphérie de la fibre par une fente orientée longitudinalement (PEACHEY, 1967). Elles sont parcourues par de petites branches nerveuses (EASTWOOD et coll., 1982). Ce système membranaire est absent chez les Vertébrés, présent chez tous les Crustacés étudiés. Il permettrait la transmission rapide du stimulus électrique au centre d'une fibre de gros diamètre et donc l'activation simultanée de toutes les myofibrilles, même les plus profondes.

b - Le système tubulaire (Fig. 2)

A partir de la membrane de surface et des clefts, le système tubulaire classiquement décrit chez les Vertébrés se développe. Il se distingue des invaginations précédemment décrites par un calibre nettement inférieur. Plusieurs types de tubules ont été décrits :

- des tubules situés au niveau de la strie Z appelés tubules Z (BRANDT et coll., 1965 ; PEACHEY, 1967 ; HOYLE et coll., 1973 ; EAGLES et RIORDAN, 1980 ; EASTWOOD et coll., 1982) au niveau desquels la lame basale est présente (HOYLE et coll., 1973 ; EASTWOOD et coll., 1982). A l'aide de



Figure 3 : Coupe longitudinale de fibre musculaire d'Ecrevisse mettant en évidence l'organisation du RS et ses relations spatiales avec le système contractile.

Le manchon fenestré de réticulum sarcoplasmique est visible sur la vue tangentielle d'une myofibrille (SR), il se différencie aux quarts externes de la bande A en citernes terminales (astérisque).

A gauche, la même structure vue en coupe révèle la double couche de canalicules du réticulum sarcoplasmique (flèche) entre deux myofibrilles ainsi que les diades (D).

Les sarcomères sont délimités en haut à droite et en bas à gauche par les stries Z, noires et sinueuses. Deux demi-bandes I (en clair) encadrent la bande A centrale caractérisée par les filaments épais.

Encart : vue agrandie d'une citerne terminale.

Microscopie électronique X 22000 (encart X 44000)

(D'après EASTWOOD et coll., 1982).

la technique du cryodécapage, EASTWOOD et coll. (1982) montrent que les tubules Z sont dépourvus de particules intramembranaires contrairement aux tubules T que nous étudierons plus loin.

- des tubules A situés au niveau de la bande A. Ils pourraient être soit dissociés anatomiquement des tubules Z (PEACHEY, 1967), soit le résultat de la division des tubules Z se prolongeant le long des disques A (BRANDT et coll., 1965 ; EAGLES et RIORDAN, 1980). Ils formeraient des structures jonctionnelles avec le réticulum sarcoplasmique (RS) : les *diades* (BRANDT et coll., 1965 ; EAGLES et RIORDAN, 1980).

- des tubules T mis en évidence en cryodécapage et se distinguant des tubules Z par l'absence de lame basale, un diamètre plus petit et l'existence de particules intramembranaires. De plus comme le système A antérieurement décrit ils forment des jonctions avec le RS (EASTWOOD et coll., 1982).

Il faut noter que les tubules T récemment décrits par EASTWOOD et coll. (1982) semblent correspondre aux tubules A. Cependant d'après ces auteurs ce système tubulaire serait présent dans une région plus vaste que la bande A.

En conclusion, le système tubulaire, très développé chez les Crustacés, conduit comme les clefts l'excitation électrique à l'intérieur de la fibre et réalise des contacts essentiellement bipartites avec le RS jonctionnel : les diades.

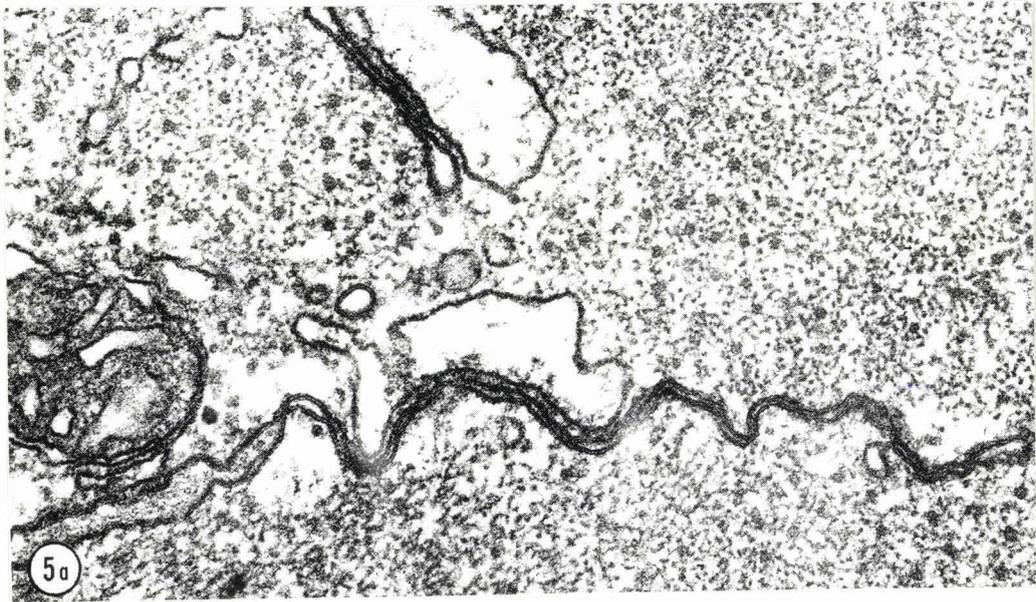


Figure 4 : Détail d'une jonction entre système tubulaire et RS (diade). Remarquer le resserrement du tubule au niveau du contact et la présence de "ponts" de matériel dense dans l'espace interjonctionnel. Les filaments fins entourant les filaments épais sont vus en coupe transversale. Leur légère irrégularité classerait plutôt la fibre dans la catégorie des fibres lentes (fibres toniques ou S).

Microscopie électronique X 76000

(D'après HOYLE et coll., 1973).

c - Le réticulum sarcoplasmique (Fig. 3 et 4).

Le réticulum sarcoplasmique des Vertébrés et des Invertébrés est un système membranaire intracellulaire, qui consiste en un réseau important de canalicules formant un manchon fenestré autour de chaque myofibrille (Fig. 3). Les canalicules du RS longitudinal se différencient de place en place, s'élargissant et s'aplatissant en citernes terminales. Ces citernes constituent le RS jonctionnel au niveau duquel s'établissent les jonctions avec le système tubulaire A ou T (Fig. 3 et 4). EASTWOOD et coll. (1982) différencient le RS jonctionnel du RS longitudinal en cryodécapage : les particules membranaires du RS jonctionnel sont plus nombreuses et d'un diamètre plus important.

Le plus souvent, chez les Crustacés, les jonctions s'effectuent entre une citerne terminale et un tubule. Elles sont dans ce cas appelées diades ou jonctions diadiques et sont spécifiques des Arthropodes (Crustacés et Insectes) à l'opposé des jonctions triadiques rencontrées chez les Vertébrés impliquant deux citernes terminales et un tubule. Cependant, HOYLE et coll. (1973) ont mis en évidence sur la balane, Balanus nubilus, quelques jonctions triadiques. Outre les jonctions diadiques le système jonctionnel des Crustacés présente deux autres caractéristiques. D'une part, un même tubule peut établir avec le RS des contacts en série avec plusieurs sarcomères successifs. D'autre part, il existe des jonctions périphériques soit entre le RS jonctionnel et les clefts soit entre le RS jonctionnel et la membrane de surface (HOYLE et coll., 1973 ; EASTWOOD et coll., 1982).

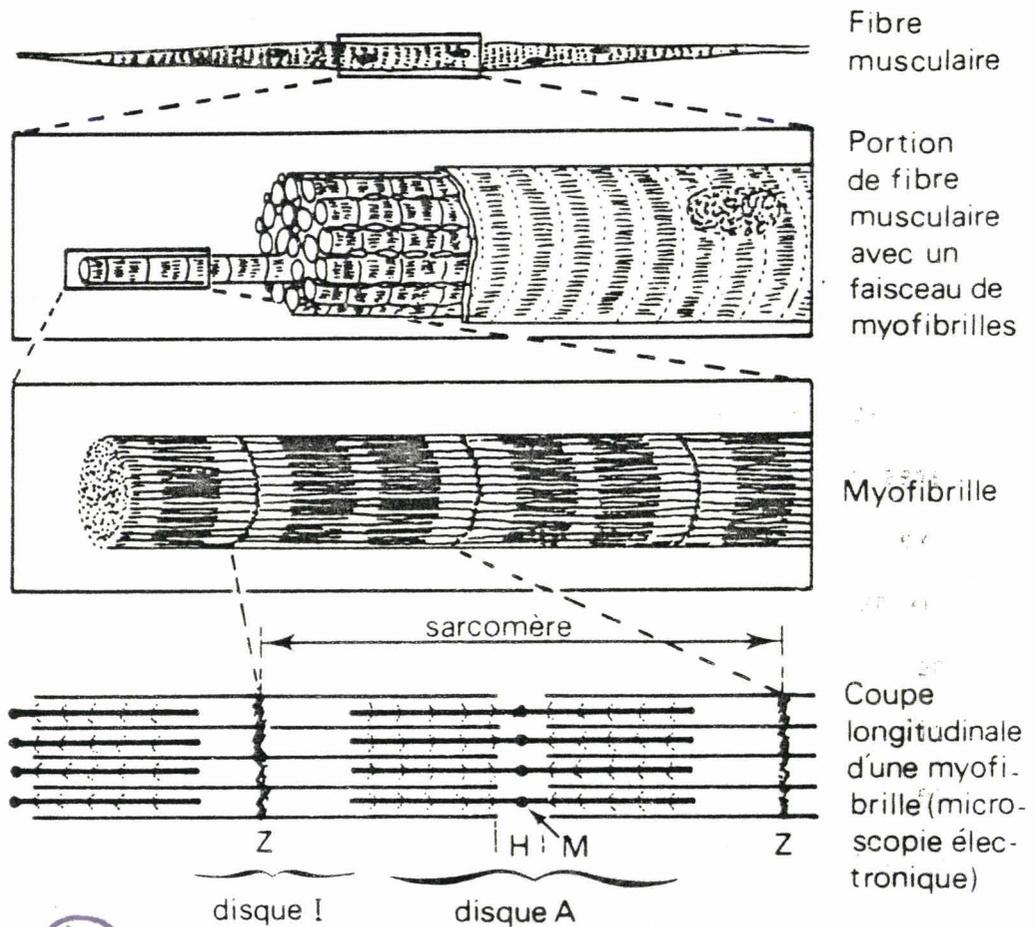


Figure 5 : Organisation d'une fibre musculaire striée squelettique. Les lettres H, M et Z désignent respectivement la bande H, la ligne M et la strie Z.

(D'après SHEELER et BIANCHI, 1980, modifiée).

2 - Les protéines contractiles

a - Description classique d'une fibre musculaire striée squelettique (Fig. 5 et 6).

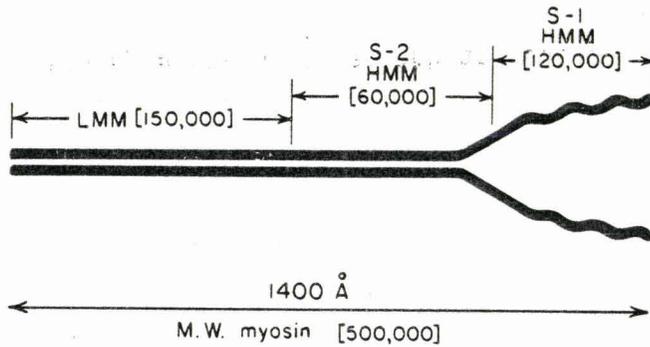
Les fibres musculaires sont formées d'un faisceau de myofibrilles, elles-mêmes constituées de sous-unités ou myofilaments disposés parallèlement à leur axe longitudinal. L'unité contractile d'une myofibrille comprise entre deux stries Z est appelée sarcomère. La microscopie électronique a permis de mettre en évidence deux types de myofilaments : les filaments fins et les filaments épais. L'agencement de ces filaments au sein d'un sarcomère détermine la striation. En effet deux types de disques ont été mis en évidence :

- les disques clairs ou isotropes (I) ne comprenant que des filaments fins
- les disques sombres ou anisotropes (A) où se chevauchent filaments épais et fins.

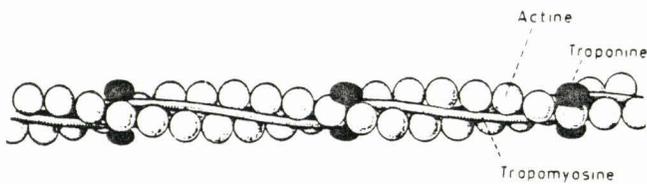
Cette striation et la répétition régulière des sarcomères associée à un alignement parfait des sarcomères des myofibrilles d'une même fibre sont responsables de l'aspect strié des fibres musculaires de Vertébrés.

Les filaments épais, caractéristiques de la bande A, sont essentiellement constitués de myosine. Cette protéine comprend 2 principaux

(A)



(B)



(C)

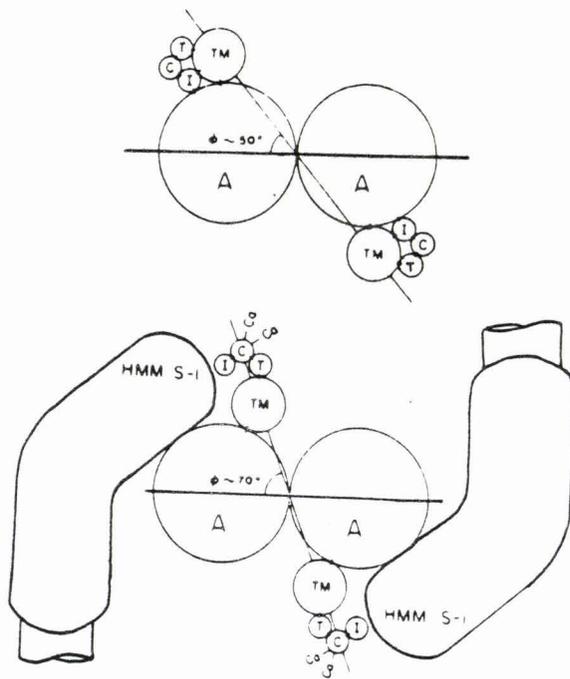


Figure 6 : Représentation schématique des protéines contractiles.

A : représentation schématique de la molécule de myosine. La molécule est divisée en méromyosine légère ou light méromyosin (LMM) et en méromyosine lourde ou heavy meromyosin (HMM). La meromyosine lourde est subdivisée en une sous-unité S_1 (S-1 HMM) et une sous-unité S_2 (S-2 HMM). Les nombres entre crochets indiquent les masses molaires.

(D'après LOWEY et coll., 1969, modifié)

B : structure moléculaire du filament fin

(D'après EBASHI et ENDO, 1968).

C : vue schématique transversale des relations spatiales entre la myosine (HMM), l'actine (A), la tropomyosine (TM) et les 3 sous-unités de la troponine (T, C, I).

En haut : en absence de calcium

En bas : en présence de calcium

(D'après POTTER et GERGELY, 1974).

constituants, la *méromyosine lourde* (HMM ou heavy meromyosin) et la *méromyosine légère* (LMM ou light méromyosin). La molécule complète est asymétrique et se présente sous la forme d'un bâtonnet de LMM surmonté à une extrémité par une masse globulaire de HMM (Fig. 6A). La HMM constitue la fraction active de la myosine. Sa sous-unité S_1 (HMM- S_1) est le siège de l'activité ATPasique et présente le site d'interaction avec l'actine.

Les filaments fins comprennent deux chaînes hélicoïdales *d'actine* polymérisée ainsi qu'un groupe de protéines régulatrices de la contraction musculaire : la *tropomyosine* (TM) et le complexe de la *troponine* (Fig. 6B).

L'actine a une très forte affinité pour l'unité S_1 de la myosine (HMM- S_1) et le contrôle de la contraction est réalisé par le groupe de protéines régulatrices (EBASHI et ENDO, 1968). La tropomyosine est une molécule très allongée qui est logée dans la gorge délimitée par les 2 chaînes des globules d'actine (Fig. 6B). Elle doit avoir un double rôle : morphologique, comme protéine servant de support à la troponine et médiateur, fonctionnant comme intermédiaire du signal entre la troponine et l'actine. La troponine est localisée de façon discontinue tous les 40 nm environ. Les rapports des divers composants du filament sont de 7 actines/1 tropomyosine/1 troponine. Le complexe de la troponine comprend 3 sous-unités (T, C, I) dont les rôles sont différents (Fig. 6C). La troponine T (T) assure la liaison entre tropomyosine et troponine C (C). La troponine C est associée à la troponine T et présente une grande affinité pour le calcium. La troponine I (I) est associée à la troponine C. En absence de calcium elle est également associée à l'actine et inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine. En présence de calcium,

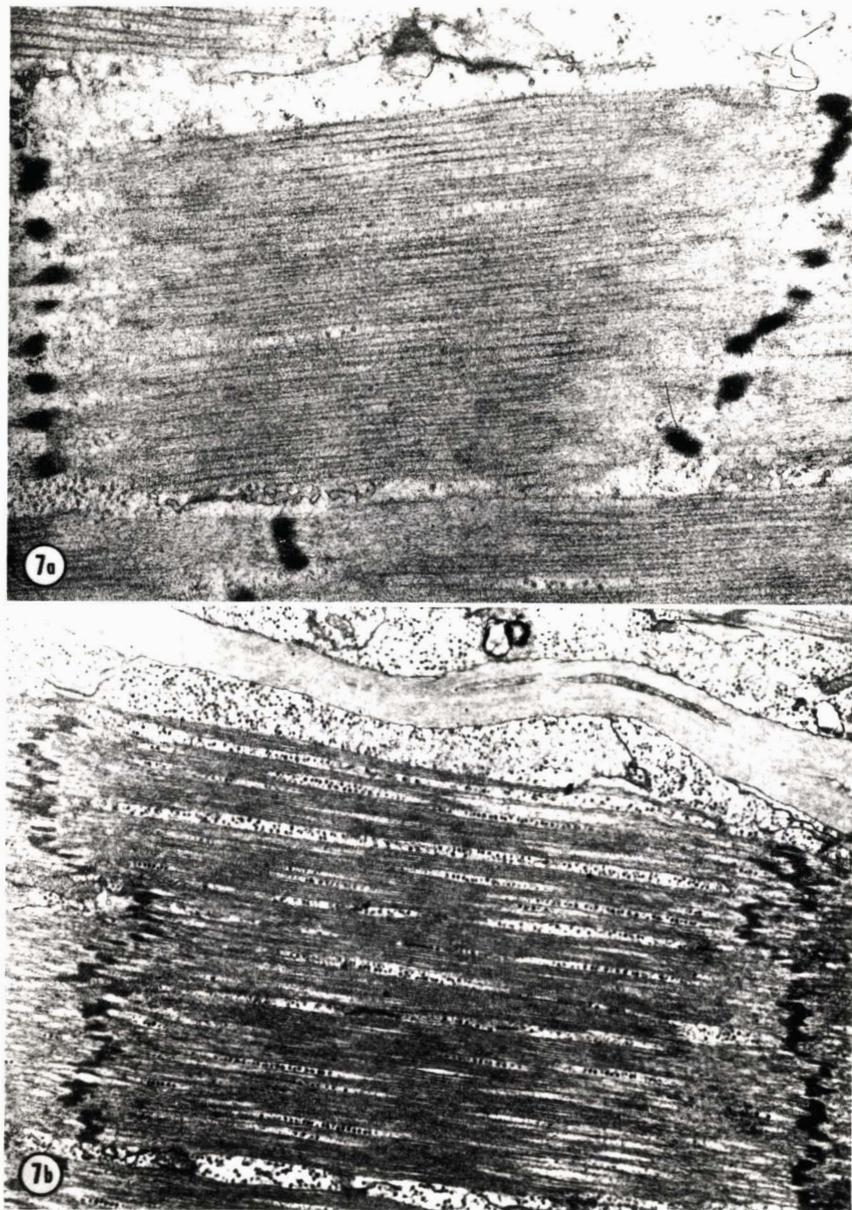


Figure 7 : Coupes longitudinales de fibre musculaire de Balane à différents grossissements illustrant la variabilité de longueur de sarcomère (7a : 5 μm ; 7b : 12 μm).

Microscopie électronique X 19000 (7a) et X 8000 (7b).

(D'après HOYLE et coll., 1973).

l'affinité de la troponine I pour l'actine diminue et la tropomyosine reprend sa place dans la gorge du filament ; ce déplacement permet l'interaction entre l'actine et la myosine (POTTER et GERGELY, 1974). Chaque molécule de troponine contrôle donc l'interaction actine-myosine sur une longueur de 40 nm.

D'après les résultats de HUXLEY, A.F. et NIEDERGERKE (1954), la contraction musculaire résulte du glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais (théorie des filaments glissants) : le glissement se fait par l'intermédiaire de "ponts" qui se forment cycliquement entre les 2 types de filaments pendant la contraction.

b - Description d'une fibre musculaire de Crustacés

Chez les Crustacés, la striation au niveau d'une fibre musculaire ainsi qu'au niveau du sarcomère est très fortement altérée. Pour un sarcomère donné, l'agencement des myofilaments est tel que les longueurs des disques A et I et de la bande H sont difficiles à déterminer (HOYLE et coll., 1973, sur la balane, Balanus nubilus). La figure 7 illustrant deux sarcomères d'une fibre musculaire de Balane, montre nettement l'irrégularité des limites de la bande A et I ainsi que celle de la ligne Z rendant la détermination de la longueur du sarcomère très incertaine (HOYLE et SMYTH, 1963). Ces irrégularités ont également été rapportées sur la fibre musculaire du crabe Portunus sp (FRANZINI-ARMSTRONG, 1966).

Des variations importantes de la longueur des sarcomères au sein d'une même fibre sont observées. Ceci est illustré sur la figure 7

représentant deux sections longitudinales de deux sarcomères différents de fibre musculaire de Balane. Le sarcomère du haut mesure 5 μm et celui du bas 12 μm . Les sarcomères de longueurs différentes ne sont pas disposés au hasard mais tendent à être regroupés dans la fibre (FRANZINI-ARSMTRONG, 1966 ; HOYLE et coll., 1973). Il faut, noter que par une étude en microscopie électronique, sur des fibres de Balane, HOYLE et coll. (1973) souligne que les variations de longueur de sarcomères ne sont pas dues à des degrés divers de chevauchement des myofilaments mais à des longueurs de disque A inégales.

Une variabilité importante est également observée au niveau du diamètre des filaments épais et de la longueur des filaments fins. Cette dernière est souvent impossible à déterminer à moins d'étirer la fibre à 200 % de sa longueur de repos (HOYLE et coll., 1973).

L'hétérogénéité qui semble la règle au sein des myofibrilles et l'absence d'alignement latéral des sarcomères (stries Z non alignées) sont la cause d'une striation transversale moins régulière de la fibre musculaire de Crustacés.

Notons également que ces irrégularités sont plus marquées sur les fibres toniques que sur les fibres phasiques (EASTWOOD et coll., 1982).

La structure des protéines impliquées dans la contraction musculaire (myosine, actine, troponine, tropomyosine) est identique à celle observée sur les fibres musculaires striées squelettiques. Cependant un désaccord existe en ce qui concerne la nature de la protéine impliquée dans

la régulation calcique de la contraction. D'après LEHMAN et SZENT-GYÖRGI, (1975) cette régulation se situerait au niveau du filament fin comme sur le muscle strié de Vertébrés. Cependant, la même équipe (LEHMAN, 1977), rapporte plus tard que cette régulation calcique pourrait être située au niveau du filament épais (myosine).

III - ORIGINE ET STOCKAGE DU CALCIUM INTRAMUSCULAIRE

A - Contrôle de la contraction par les ions calcium

Compte-tenu de l'importante bibliographie relative à ce sujet, nous avons choisi de ne présenter dans cette partie que les travaux effectués sur des fibres musculaires de Crustacés. Ceux-ci mettent en évidence un phénomène classiquement décrit sur diverses structures : la nécessité des ions calcium pour le déclenchement de la contraction. En effet, PORTZHEL et coll. (1964), en utilisant une solution tamponnée (Ca-EGTA), ont estimé la valeur seuil de $[Ca]_i$ nécessaire pour initier la contraction sur des fibres intactes. Evaluée sur les fibres musculaires géantes de Maia squinado, cette valeur varie entre 3.10^{-7} et 15.10^{-7} M alors que la concentration calcique interne de repos est inférieure à 10^{-7} M. Par une méthode comparable, HAGIWARA et NAKAJIMA (1966) et RIDGWAY et ASHLEY (1967) sur les fibres musculaires de Balane déterminèrent la plus petite valeur de $[Ca]_i$ permettant le développement d'une tension ; celle-ci varie entre 5.10^{-7} M et 9.10^{-7} M. Sur ces mêmes fibres, la $[Ca]_i$ de repos est comprise entre $0,8.10^{-7}$ M et 2.10^{-7} M (HAGIWARA et NAKAJIMA, 1966 ;

ASHLEY et RIDGWAY, 1970). Ultérieurement une détermination plus précise de la $[Ca]_i$ de repos à l'aide de la fluorescence de l'aequorine a donné une valeur de $5.89 \cdot 10^{-8}$ M (ASHLEY, 1978). On peut donc conclure, malgré une variabilité importante des résultats, que la concentration calcique intracellulaire doit au moins être multipliée par 2 pour qu'une tension se développe.

Les travaux de GILLIS (1967), sur les myofibrilles isolées de Crabe, ont permis de déterminer la zone de la fibre musculaire la plus sensible aux ions calcium (Ca^{++}). En effet, par l'injection d'ions calcium à l'aide d'une micropipette le long du sarcomère, il a mis en évidence que plus la pipette d'injection est proche de la jonction A-I, plus la quantité de Ca^{++} nécessaire pour produire la plus petite contraction peut être réduite. Or, les travaux de SELVERSTON (1967) sur les fibres musculaires de Balane et de Crabe ont montré que la zone de la jonction A-I est la zone des diades.

La nécessité de l'augmentation de la $[Ca]_i$ pour qu'une tension se développe est donc bien établie. De plus, les travaux de RIDGWAY et ASHLEY (1967) et ASHLEY et RIDGWAY (1968) sur le muscle strié de Balane ont permis de visualiser l'augmentation ; leurs résultats obtenus en mesurant la variation de la concentration en ions calcium directement à l'aide d'une méthode optique (fluorescence de l'aequorine) prouvent que l'augmentation est transitoire et a une durée inférieure à celle de la contraction (Fig. 8).

Le point que nous nous proposons d'exposer maintenant va donc consister à analyser par quels mécanismes la $[Ca]_i$, dont le rôle apparaît déterminant, est augmentée.

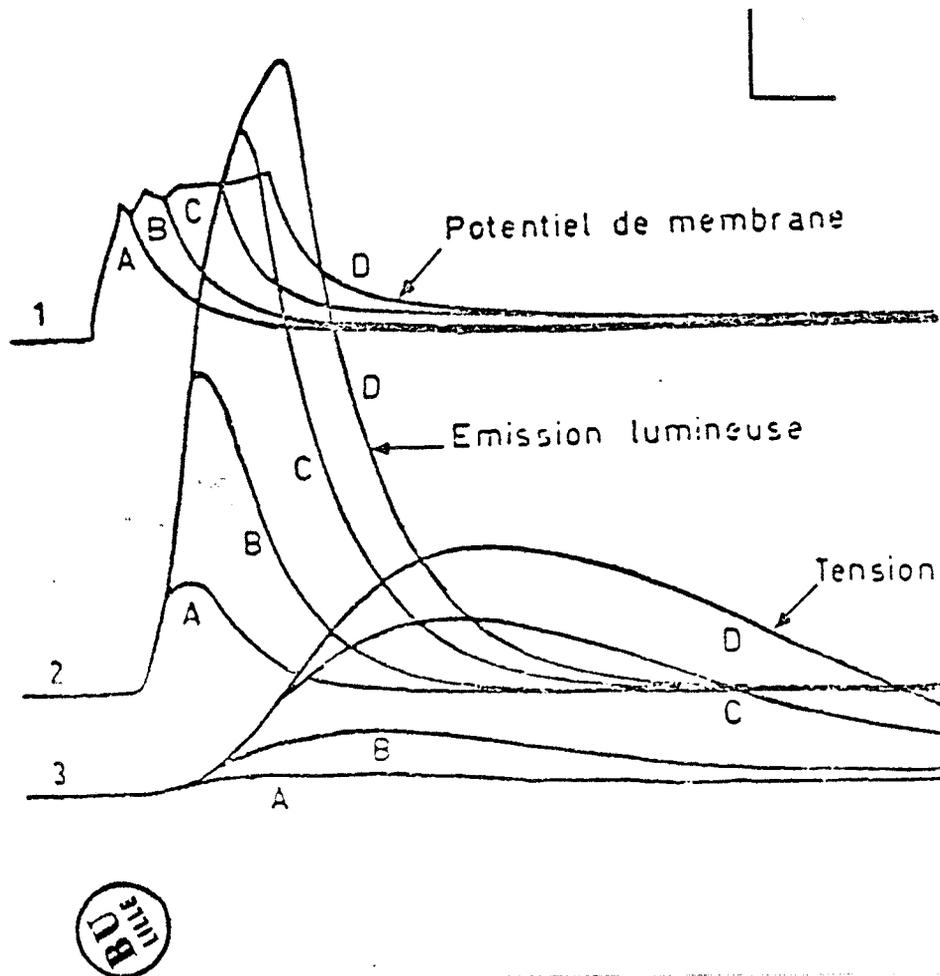


Figure 8 : Enregistrement simultané du potentiel de membrane (1) (dépolariation vers le haut), de l'émission de lumière (2) traduisant l'élévation de $(Ca^{2+})_i$ et de la tension mécanique (3) d'une fibre musculaire de Balane, contenant de l'aequorine et dépolariée pendant différents temps de durée croissante (A, B, C, D).

Etalonnage dans le coin supérieur droit : verticalement pour la trace du potentiel de membrane : 1,20 mV ; pour l'intensité lumineuse $1,9 \times 10^{-9}$ lumen ; pour la tension : 5 g ; horizontalement 100 msec.

(D'après ASHLEY et RIDGWAY, 1968).

B - Mécanisme d'augmentation de la concentration calcique intracellulaire

1 - Influence de la concentration calcique extracellulaire

a - Rôle du courant entrant calcique

Les études effectuées dans les conditions de *potentiel imposé* ont permis de mettre en évidence sur la plupart des tissus contractiles l'existence d'un *courant entrant calcique*, I_{Ca} . Ce courant est *responsable de l'activité électrique membranaire*, dans le cas des fibres musculaires de Crustacés (HAGIWARA et NAKA, 1964 ; MOUNIER et VASSORT, 1973, 1975 a ; HENČEK et ZACHAR, 1977).

Ce flux entrant d'ions Ca^{++} crée une augmentation transitoire de $[Ca]_i$. Pour certains auteurs cette variation de $[Ca]_i$ est essentielle dans le déclenchement de l'activité mécanique. En effet, ils montrent que l'apparition de la tension est très intimement liée à l'activation de I_{Ca} puisque divers ions ou drogues inhibant I_{Ca} bloquent le développement de la réponse mécanique. C'est notamment le cas pour le manganèse (SUAREZ-KURTZ et coll., 1972, sur les fibres musculaires d'Ecrevisse ; GOBLET et MOUNIER, 1982, sur les fibres musculaires de Crabe), pour le cobalt (HAGIWARA et coll., 1968, sur les fibres musculaires de Balane ; MATSUMURA, 1972, sur les fibres musculaires d'Ecrevisse) et pour la streptomycine (SUAREZ-KURTZ, 1974, sur les fibres musculaires de Crabe). De plus, un autre résultat confirme cette hypothèse : une concentration calcique extracellulaire accrue induit une augmentation de I_{Ca} (MOUNIER et VASSORT, 1975 a ; CAPUTO

et DIPOLO, 1978) et un accroissement de l'amplitude de la tension (HAGIWARA et coll., 1968 ; CAPUTO et DIPOLO, 1978, sur les fibres musculaires de Balane, GOBLET et MOUNIER, 1982, sur les fibres musculaires de Crabe).

b - Rôle de l'échange sodium-calcium

Lorsque la polarisation membranaire est égale à la polarisation membranaire de repos, un mécanisme d'échange sodium-calcium fonctionne dans le sens d'un efflux calcique associé à un influx sodique afin de permettre le retour de la concentration calcique intracellulaire à un niveau faible par rapport à celle de la solution externe (RUSSELL et BLAUSTEIN, 1974 - sur la fibre musculaire de Balane ; VAUGHAN-JONES, 1977, sur la fibre musculaire de Crabe ; HORÁČKOVÁ et VASSORT, 1979, sur l'oreillette de Grenouille). Lorsque la membrane est dépolarisée, l'efflux calcique est diminué (MULLINS et BRINLEY Jr., 1975, sur l'axone de Calmar) et l'échange s'inverse et fonctionne dans le sens d'un influx calcique associé à un efflux sodique (HORÁČKOVÁ et VASSORT, 1979)

A la lumière de ce résultat, GOBLET et MOUNIER (1982) ont montré par l'enregistrement simultané des courants ioniques membranaires et de la contraction que, outre l'existence d'une composante phasique de contraction dépendante de I_{Ca} , il existe sur les fibres musculaires du crabe Carcinus maenas une composante tonique dépendante de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation du sarcolemme et plus particulièrement du flux entrant d'ions Ca via l'échange sodium-calcium. Ces auteurs ont montré par utilisation de divers ions ou drogues que ce flux entrant de Ca est nécessaire au développement de la tension tonique. En conclusion, deux flux entrants calciques sont nécessaires au développement de l'activité mécanique complexe des fibres musculaires de Crabe.

Il faut maintenant savoir si l'influx de calcium produit lors d'une dépolarisation membranaire est suffisant pour permettre le développement d'une tension. Divers auteurs, sur diverses structures ont effectué une estimation de la quantité de Ca^{++} entrant lors du développement de I_{Ca} et l'augmentation de $[\text{Ca}]_i$ qui en résulte. Ceux-ci démontrèrent que *les ions calcium se fixent directement sur les protéines contractiles et sont en quantité suffisante pour induire la contraction.* Ce résultat a été obtenu sur la fibre musculaire de Balane (ATWATER et coll., 1974).

Un tel couplage a été dénommé couplage direct ou "direct coupling" (BIANCHI, 1969).

D'autres auteurs estiment que la petite quantité de calcium entrant lors d'un potentiel d'action est *essentielle mais insuffisante* pour produire l'activation du système contractile des fibres musculaires de Crustacés (BRANDT et coll., 1972 ; ENDO, 1972 ; CAPUTO et DIPOLO, 1978 ; GOBLET et MOUNIER, 1982).

Il est donc nécessaire d'envisager une autre origine pour le calcium activateur de la contraction.

2 - La libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique

Depuis les études de COSTANTIN et coll. (1964) et WINEGRAD (1968) on sait qu'une structure intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique (RS), est une zone de stockage de calcium. En effet, la concentration intraréticulaire en calcium libre est proche de 0.5 à 2 mM et les citernes terminales du RS contiennent 90 % de cette quantité (HASSELBACH et OETLIKER,

1983). De plus, la membrane du RS présente deux propriétés : i) augmenter considérablement sous certaines conditions sa perméabilité calcique induisant ainsi un largage massif de Ca dans le myoplasme (JÖBSIS et O'CONNOR, 1966 ; RIDGWAY et ASHLEY, 1967 ; ASHLEY et RIDGWAY, 1970), ii) capter le Ca situé dans le myoplasme et l'accumuler (HASSELBACH et MAKINOSE, 1961 ; EBASHI et LIPMAN, 1962). En effet, un cycle de contraction - relaxation nécessite le largage et la capture d'environ 100 nmol de Ca par gramme de muscle (WEBER et HERZ, 1963).

Lors d'une excitation créant un tétanos, 59 % du contenu des citernes terminales est largué en 1.2 sec (SOMLYO et coll., 1981). Cependant, la nature du message permettant l'accroissement de la perméabilité calcique de la membrane du RS lors de l'excitation est encore très controversée. Plusieurs hypothèses existent :

- La dépolarisation membranaire de la membrane de surface et du système tubulaire se propagerait au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cette dépolarisation induirait un largage massif de calcium dans le milieu sarcoplasmique. Ce mécanisme est appelé "depolarization-induced calcium release" (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967 ; ENDO et NAKAJIMA, 1973 ; KASAI et MIYAMOTO, 1976).

- La petite augmentation de la concentration calcique intracellulaire due au développement de l'influx calcique créé par la dépolarisation membranaire de surface induirait une libération du calcium sequestré dans le RS. Ce mécanisme est appelé "calcium-induced calcium release" (FORD et PODOLSKY, 1968 sur les fibres squelettiques ; FABIATO et FABIATO, 1975 a sur les fibres cardiaques ; SAIDA, 1982, sur le muscle lisse).

- Le largage calcique serait dû à l'inversion du fonctionnement de la pompe Ca-ATPase (TAKENAKA et coll., 1982).

- Le largage calcique serait dû à la formation d'un canal calcique par association de plusieurs ATPases sous l'influence des ions Ca^{++} (CHIESI, 1984).

- Le réticulum sarcoplasmique serait un compartiment ouvert sur le milieu extracellulaire (PAGE et PAGE, 1968 ; BIRKS et DAVEY, 1969).

- Des changements de pression osmotique de part et d'autre de la membrane du RS moduleraient la perméabilité calcique (MEISSNER et Mc KINLEY, 1976).

- Les charges spécifiques sur la surface membranaire du RS contrôlerait des canaux calciques au niveau du RS (SCHNEIDER et CHANDLER, 1973 ; SHOSHAN et coll., 1983).

Nous allons examiner de façon plus précise chacune des hypothèses.

a - Mécanisme de "depolarization-induced Ca release"

L'hypothèse d'un largage calcique à partir du RS dû à la dépolarisation de la membrane du RS est le résultat du fait expérimental suivant obtenu sur les fibres musculaires squelettiques pelées : après remplacement du propionate de potassium du milieu environnant le RS par du chlorure de potassium une tension transitoire se développe (REUBEN et coll., 1967 ;

COSTANTIN et PODOLSKY, 1967). Les réponses mécaniques observées sont augmentées lorsque la concentration d'ions chlore utilisée est accrue (WINEGRAD, 1982).

De nombreux travaux ont été effectués afin de déterminer des inhibiteurs spécifiques du largage induit par les ions chlore pour permettre de dissocier ce mécanisme du mécanisme de "Ca-induced Ca release" que nous étudierons plus loin. Les résultats montrent que les sucres (THORENS et ENDO, 1975) ainsi que le manganèse (SAIDA et SUZUKI, 1981) inhibent le mécanisme de "depolarization induced Ca release", alors que les ions magnésium ou la procaïne sont sans effet (THORENS et ENDO, 1975). De plus, des canaux cationiques et plus particulièrement potassiques dépendants du potentiel ont été mis en évidence dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (MILLER, 1978 ; MILLER et ROSENBERG, 1979 ; YAMAMOTO et KASAI, 1982 a et b).

L'éclairage d'une fibre musculaire située entre deux polariseurs croisés (technique de la polarisation croisée bien connue des cristallographes), permet d'enregistrer des variations importantes de l'intensité lumineuse résultante, lors de la stimulation de la fibre (BAYLOR et OETLIKER, 1977 a, b et c). Cette variation d'intensité lumineuse appelé "birefringence signal" * par les auteurs est l'image non proportionnelle de variations de potentiels transmembranaires. Elle peut-être décomposée en trois composantes :

* Comme l'ont noté BAYLOR et OETLIKER, (1977 a) signalons que le terme "birefringence signal" ne signifie pas nécessairement qu'il y ait une modification des propriétés de biréfringence de la fibre. Il signifie simplement qu'il y a une variation de l'intensité lumineuse mesurée après le passage du faisceau lumineux incident au travers d'une fibre située entre deux polariseurs croisés.

- la première composante correspond au potentiel d'action de la membrane de surface et du système T (BAYLOR et OETLIKER, 1977 c).

- la seconde qui, dans ce paragraphe est celle qui nous intéresse, serait la conséquence de la dépolarisation de la membrane du réticulum sarcoplasmique associée au largage calcique (BAYLOR et OETLIKER, 1977 c).

Ces deux premières composantes sont antérieures au développement de la contraction.

- la troisième composante qui se développe simultanément à la contraction, serait un artefact dû au mouvement de la fibre (BAYLOR et OETLIKER, 1977 a).

A l'aide d'une autre technique optique basée sur l'utilisation d'une substance fluorescente, le bleu Nil A, dont l'émission fluorescente varie lors de changements de potentiel membranaire, BEZANILLA et HOROWICZ (1975) ont montré, sur un muscle stimulé, une augmentation de la fluorescence pendant la phase de repolarisation du PA, juste avant le début de la contraction. Ce phénomène, augmenté par NO_3^- (potentiateur de la contraction musculaire, SANDOW, 1965) et diminue par D_2O (inhibiteur de la contraction), semble correspondre à la libération de calcium par le RS.

Ces résultats, complétés par ceux de FABIATO et FABIATO (1977) à l'aide de la mérocyanine (marqueur de variations de potentiel) sur le muscle squelettique, permettent d'envisager que *les changements de propriétés optiques sont dus à des changements des propriétés électriques de la membrane du RS*. Toutefois un certain nombre de résultats actuels laissent

encore planer un doute sur le fait que la membrane du RS serait polarisée au repos et capable d'être dépolarisée lors de l'excitation musculaire.

L'existence d'une polarité de repos n'a jamais été prouvée et des travaux récents nient son existence. En effet, SOMLYO et coll. (1981) ont montré sur les fibres musculaires de grenouille que le potentiel transmembranaire du RS, s'il existe, est très petit car il est inférieur ou égal à 5 mV. De façon identique, un rapport plus récent (GARCIA et MILLER, 1984), sur des vésicules isolées de muscle squelettique de lapin indique que la membrane du RS ne peut développer dans des conditions physiologiques un potentiel supérieur à quelques mV.

D'autre part, d'autres travaux effectués à l'aide de colorants sensibles au potentiel font état d'une séparation nette entre les modifications du signal optique du colorant et le largage calcique (BEELER et MARTONOSI, 1979 ; BEELER et coll., 1979). De façon identique, FABIATO (1982) fait remarquer que ses travaux effectués à l'aide des colorants sensibles au potentiel (FABIATO et FABIATO, 1977, 1978 a ; FABIATO, 1981) ne permettent pas de savoir si le signal enregistré correspond à une variation de potentiel transmembranaire ou à une variation de potentiel de surface (voir RUSSELL et coll., 1979 a, 1979 b pour la discussion de ce problème). Des travaux effectués avec d'autres techniques montrent d'une part une absence de corrélation entre la "dépolarisation" des vésicules isolées du RS et le largage calcique (KOSHITA et HOTTA, 1981), d'autre part que le largage calcique lors d'un tétanos n'est pas associé à des modifications importantes ou maintenues du petit signal transmembranaire (SOMLYO et coll., 1981).

Il y aurait donc une tendance actuelle dans la bibliographie à réfuter l'hypothèse de "depolarization - induced Ca release". Il ne faut cependant pas oublier que l'ensemble des travaux cités ont été effectués soit sur des fibres musculaires pelées soit sur des vésicules isolées du RS c'est à dire dans des conditions telles que la zone clef du couplage excitation - contraction, la triade ou diade, est détruite.

b - Mécanisme de "calcium - induced calcium release"

FABIATO et FABIATO (1975 a), furent les premiers à émettre l'hypothèse, sur les cellules musculaires cardiaques, d'un largage calcique induit par une petite quantité de calcium entrant dans la cellule, insuffisante pour activer directement les protéines contractiles. Depuis, ce mécanisme a été mis en évidence sur d'autres structures musculaires notamment sur les fibres musculaires squelettiques de Grenouille (MILLER et THIELECZEK, 1977 ; KIRINO et SHIMIZU, 1982) et de Lapin (KIRINO et SHIMIZU, 1982), sur les fibres musculaires striées de Crabe (STEPHENSON et WILLIAMS, 1980) ainsi que sur le muscle lisse (SAIDA, 1982 ; SAIDA et VAN BREEMEN, 1983) et au niveau des vésicules isolées de réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique (NAGASAKI et KASAI, 1981 ; MIYAMOTO et RACKER, 1981). SAIDA et VAN BREEMEN (1983) et FABIATO (1983) montrent également que le largage calcique est stimulé puis inhibé par l'augmentation de la concentration calcique environnant le réticulum sarcoplasmique.

Afin de pouvoir dissocier les mécanismes de "depolarization - induced calcium release" et de calcium - induced calcium release" des inhibiteurs propres à ce dernier mécanisme ont été déterminés. Les ions magnésium (FORD et PODOLSKY, 1970, 1972 ; ENDO et NAKAJIMA, 1973 ; ENDO, 1975) et la procaine (FORD et PODOLSKY, 1972 ; THORENS et ENDO, 1975) inhibent

le mécanisme de largage calcique dépendant du calcium. Ces résultats sont contraires à ceux obtenus dans le cadre d'un mécanisme de largage induit par les ions chlore et ont conduit THORENS et ENDO (1975) à conclure à l'indépendance de ces deux types de stimulation du largage calcique. Un autre inhibiteur a plus récemment été mis en évidence : le rouge de ruthénium (OHNISHI, 1979 ; MIYAMOTO et RACKER, 1981). De plus, le mécanisme de "Ca-induced Ca release" est stimulé par la caféine (ENDO, 1975) et plus largement par les méthylxanthines qui ne sont pas méthylées en position 9 (MILLER et THIELECZEK, 1977) ainsi que par l'adénine (ENDO et KITAZAWA, 1976). Il est insensible aux ions manganèse (SAIDA et SUZUKI, 1981). Ce mécanisme de largage du calcium est gradué (FABIATO et FABIATO, 1975 a), ce qui est en accord avec l'évolution parallèle de la tension et du courant entrant d'ions calcium en fonction de la polarisation membranaire. En outre, la libération calcique ne serait pas seulement fonction de la concentration du calcium libre qui l'induit mais aussi dépendante de la charge calcique du RS : une diminution de la concentration intravésiculaire en calcium inhiberait l'efflux calcique à partir des vésicules du RS (WEBER, 1971).

Depuis la formulation de l'hypothèse du mécanisme de type "calcium - induced calcium release" comme mécanisme de largage calcique à partir du RS, des critiques ont été formulées (ENDO, 1977) mais aussi un affinement de la compréhension de ce mécanisme a été effectué. En effet des travaux récents mettent en évidence sur la fraction lourde des vésicules isolées du RS, c'est-à-dire sur les citernes terminales du RS, un canal cationique contrôlé par les ions calcium (YAMAMOTO et KASAI, 1982 a et 1982 c). Ce canal se divise en un ionophore pouvant se présenter sous deux conformations (ouverte - fermée) et en un récepteur calcique régulant la conformation de l'ionophore (YAMAMOTO et KASAI, 1982 d). A la lumière de cette hypothèse YAMAMOTO et KASAI (1982 d) proposent un mode de fonctionnement de la caféine, drogue connue pour stimuler le mé-

canisme du "Ca - induced Ca release" : la caféine augmenterait l'affinité du calcium pour le site récepteur du canal. Par contre la procaine bloquerait le canal d'une façon dépendante du calcium.

Dans une récente revue de question ainsi que dans une série d'articles, FABIATO (1983, 1985 a,b,c) rapporte que le stimulus du mécanisme de "Ca - induced Ca release" n'est pas une faible augmentation de la concentration calcique dans le milieu environnant le RS mais serait plus particulièrement une fonction de la vitesse de cette variation de concentration calcique. A la lumière de ce résultat il tente d'expliquer comment ce mécanisme de largage calcique observé sur des cellules cardiaques pelées peut intervenir dans le couplage excitation - contraction de cellules intactes. D'après lui, la composante initiale rapide du courant entrant calcique au niveau du sarcolemme, déclencherait le largage calcique à partir du RS alors que la composante lente de ce courant chargerait le réticulum en calcium.

c - Le largage calcique en relation avec la protéine responsable de la capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique.

Plusieurs hypothèses existent selon lesquelles la protéine responsable de la capture du calcium par le RS (pompe Ca - ATPase ; voir plus loin le paragraphe C) jouerait un rôle dans le largage calcique à partir du RS. Ces hypothèses sont les suivantes :

- le largage calcique serait dû à l'inversion du fonctionnement de la pompe Ca - ATPase ("Reversal of the pump").
- les molécules de Ca - ATPase s'associeraient pour former un canal calcique.

la libération calcique due à l'inversion de la pompe
Ca - ATPase.

La Ca - ATPase peut être amenée à catalyser la réaction inverse du transport de calcium, c'est-à-dire amenée à synthétiser de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) à partir de l'Adénosine DiPhosphate (ADP) et de phosphate inorganique aux dépens d'un flux de Ca d'une forte concentration intravésiculaire vers une très faible concentration dans le milieu extraréticulaire (HASSELBACH, 1981 ; TAKENAKA et coll., 1982 ; FABIATO, 1982).

En effet, après accumulation du calcium dans le réticulum sarcoplasmique, on observe une fuite de calcium très modérée qui est accélérée 10 à 50 fois sous l'influence d'ADP et de phosphate inorganique (BARLOGIE et coll., 1971 ; BEELER et coll., 1979 ; HASSELBACH, 1981).

Cette réaction serait due à l'inversion de la pompe puisqu'une synthèse nette d'ATP peut être aisément mise en évidence durant ce largage calcique (MAKINOSE et HASSELBACH, 1971).

La stoechiométrie de la réaction est la même qu'au cours de l'accumulation c'est-à-dire que l'ATP se forme à raison d'une molécule pour la fuite de deux ions Ca (HASSELBACH, 1981). L'efflux calcique via l'inversion de la pompe a été évalué à 145 nmol/(mg.min) (TAKENAKA et coll., 1982). Pourtant, un rapport contradictoire a montré que l'ADP inhibe l'efflux calcique (PICK et BASSILIAN, 1983).

Ce mécanisme d'inversion de la pompe suggère que l'efflux calcique a lieu via la phase protéique de la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cependant, d'autres hypothèses existent qui tout en montrant la nécessité

de la Ca-ATPase pour le largage calcique ne concluent pas à un mécanisme d'inversion de la pompe.

. Canal calcique formé par l'association de plusieurs Ca-ATPases

BERMAN (1982) rapporte qu'une bicouche lipidique artificielle préparée à partir des phospholipides issus de la membrane du réticulum est imperméable aux cations. Cependant l'incorporation dans de telles vésicules de la Ca - ATPase purifiée augmente la conductance calcique par un facteur de 10^4 à 10^6 c'est-à-dire atteignant ainsi une valeur comparable à celle observée sur les vésicules isolées du réticulum sarcoplasmique (JILKA et coll., 1975). Il semblerait que le canal calcique soit situé dans la Ca-ATPase ou que l'ATPase rompe l'association des lipides afin de permettre le passage des ions calcium. Une autre possibilité existe selon laquelle plusieurs oligomères de l'ATPase forment le canal calcique. En effet, une association transitoire et réversible de plusieurs molécules d'ATPase pourrait fournir la base structurale d'un largage calcique rapide (VANDERKOOI et coll., 1977). L'ATPase transporteuse pourrait être une structure dimérique et une aggrégation pourrait être nécessaire pour la formation transitoire de canaux calciques (CHIESI, 1984). Le passage rapide d'une conformation à l'autre pourrait être induit soit par un changement rapide de la concentration ou de la distribution des ions H^+ ou Ca^{++} (CHIESI, 1984) soit par une modification du potentiel de surface (DUX et MARTONOSI, 1983 a, 1983 b).

Cependant, d'autres résultats montrent que les ions Ca^{++} passent via la phase lipidique puisqu'un anion lipophile, le tétraphénylboron induit un largage calcique ne passant pas par des canaux formés par la molécule ATPasique (SHOSHAN et coll., 1983). D'autres auteurs estiment que le site de largage calcique est de nature lipoprotéique (DHALLA et coll., 1983).

d - Relation entre le mécanisme de "Ca-induced Ca release" et le mécanisme faisant intervenir la pompe Ca - ATPase

Une fixation calcique rapide sur la membrane du RS (MC COLLUM et coll., 1972 ; ENTMAN et coll., 1972) et plus particulièrement sur les sites à grande affinité calcique de la pompe (Ca - ATPase) (INESI, 1979) augmente la perméabilité calcique de cette membrane. Les travaux de ENDO et KITAZAWA (1976) montrent que le mécanisme de "calcium-induced calcium release" présente une grande dépendance vis à vis de l'ATP de façon telle que l'ATP libre inhibe ce mécanisme. Ce résultat suggère que le mécanisme de "calcium - induced calcium release" aurait quelque relation avec le mécanisme de transport via la Ca-ATPase. Il faut cependant noter que le mécanisme de "calcium - induced calcium release" n'est pas le mécanisme d'inversion de la pompe (ENDO, 1977 ; KATZ et coll., 1977). On pourrait envisager que, dans ces conditions, la pompe calcique est découplée de l'hydrolyse d'ATP et joue le rôle de transporteur pour le largage calcique induit par le calcium (ENDO et KITAZAWA, 1976).

e - Autres hypothèses

Le réticulum sarcoplasmique serait un compartiment extracellulaire (PAGE et PAGE, 1968 ; BIRKS et DAVEY, 1969) puisque des ions, des molécules non chargées et même des marqueurs extracellulaires peuvent pénétrer dans le réticulum sarcoplasmique probablement au niveau des triades (SPERELAKIS et coll., 1973). Les évaginations de la membrane du réticulum (feet) observées en microscopie électronique par FRANZINI - ARMSTRONG (1970), EISENBERG et EISENBERG (1982) et FRANZINI-ARMSTRONG et NUNZI (1983) sont reliées à la membrane du système tubulaire transverse (STT) par un matériau amorphe et pourraient être la structure permettant la continuité entre le STT et le RS. Dans ces conditions, lors de l'excitation, la variation du potentiel membranaire (dépolérisation) qui se propage du sarcolemme vers les tubules transverses pourrait continuer directement vers les citernes terminales du RS et permettre le largage du calcium vers le myoplasme. Cependant, certains résultats indiquent que les évaginations ne jouent aucun rôle dans le mécanisme de largage calcique (MIYAMOTO et RACKER, 1981).

Des changements de pression osmotique de part et d'autre de la membrane du RS augmentent la perméabilité calcique (MEISSNER et Mc KINLEY, 1976 ; KOSHITA et coll., 1982). Ce pourrait être, par exemple, le mécanisme d'action des ions chlorure : l'importance de l'osmolarité sur le largage calcique induit par substitution ionique est actuellement à déterminer. Ainsi l'apport de chlore, ion perméant, provoquerait une augmentation du volume intraréticulaire par entrée d'eau, induisant la libération de calcium (KASAI et MIYAMOTO, 1976, sur des vésicules isolées de RS).

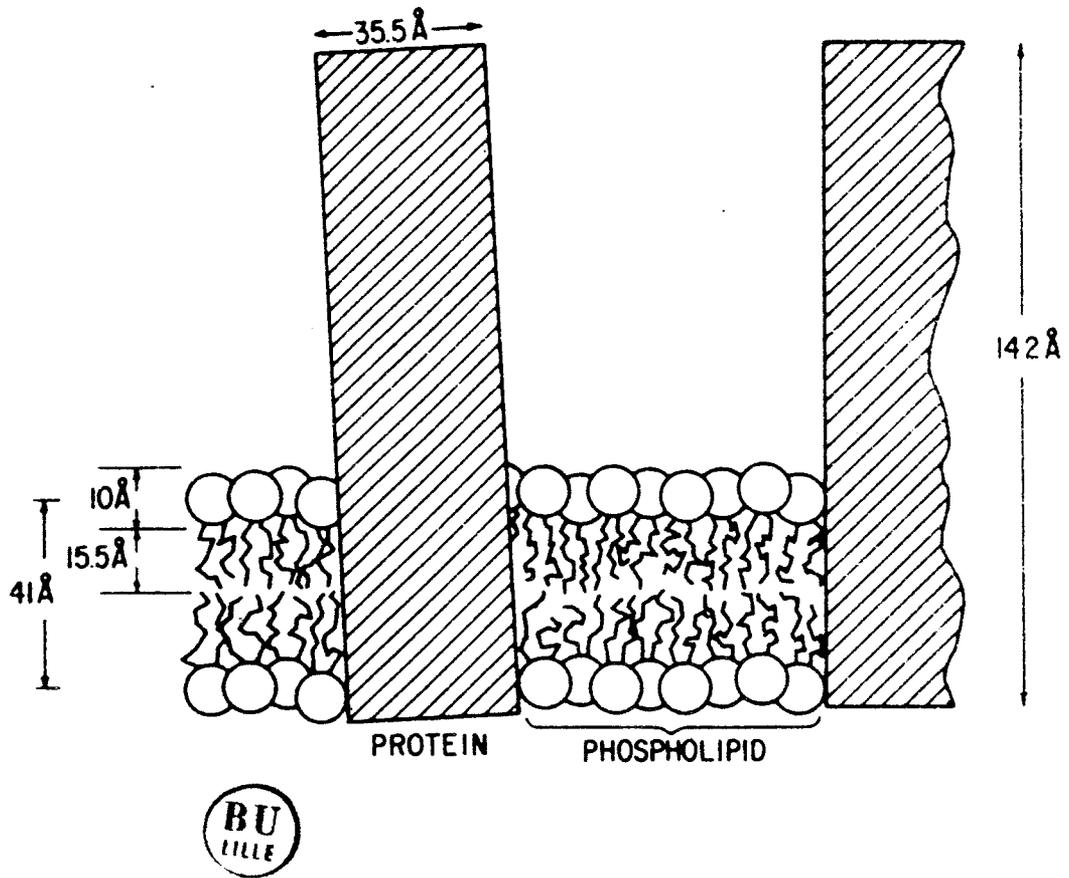


Figure 9 : Représentation schématique de la membrane du réticulum sarco-plasmique

(D'après BRADY et coll., 1982).

Des protéines situées entre le système tubulaire et le réticulum sarcoplasmique viendraient ouvrir ou fermer des canaux calciques au niveau des citernes du réticulum sarcoplasmique. La position des protéines serait déterminée par les mouvements de charges, eux-mêmes dépendants de la polarisation de la membrane du système tubulaire (SCHNEIDER et CHANDLER, 1973 ; CHANDLER et coll., 1976). Cependant, dans sa revue de question HASSELBACH (1981) rapporte que les constituants membranaires chargés auraient peu d'importance dans le mécanisme de largage calcique.

C - Stockage du calcium par le réticulum sarcoplasmique : mécanisme de diminution de la concentration calcique intracellulaire

Le rôle relaxant du réticulum sarcoplasmique mis en évidence par HASSELBACH et MAKINOSE (1961) et EBASHI et LIPMANN (1962) est la conséquence de la capture du calcium par l'intermédiaire d'une ATPase située dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cette capture calcique et le maintien d'un gradient calcique de $1/10^4$ à $1/10^5$ de part et d'autre de la membrane du RS constituent une part importante du métabolisme musculaire.

1 - Structure de l'ATPase

La protéine porteuse de l'activité ATPasique est insérée dans la bicouche lipidique d'une façon très asymétrique (BRADY et coll., 1982) (Fig. 9). Elle a été isolée à l'état pur et les vésicules sarcoplasmiques obtenues après fractionnement soigneux contiennent en effet un polypeptide de poids moléculaire environ 100 000 qui représente selon les auteurs 40 à 60 % (INESI, 1972) ou 90 % (MEISSNER, 1975) des protéines totales.

Cette protéine contient 28 à 30 molécules de phospholipides et elle possède une activité ATPasique dépendante du calcium. Si elle est débarrassée des phospholipides, elle perd son activité enzymatique. L'activité enzymatique varie selon la nature du phospholipide, la lécithine étant la plus favorable, mais elle dépend beaucoup également de la longueur des chaînes d'acides gras. Cette protéine présente 4 classes de sites de fixation pour les ions divalents. Deux sites ont une grande affinité pour le calcium et sont situés à l'extérieur de la membrane. Leur constante apparente d'association est égale à $1.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Ils sont responsables de la fixation calcique initiale avant le transport proprement dit. Un site est un site de fixation pour le magnésium et sa constante apparente d'association est égale à $6.0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Ce site permet au magnésium de jouer son rôle de catalyseur de la réaction enzymatique. Enfin, il existe un autre site calcique situé à l'intérieur de la membrane (KALBITZER et coll., 1978). Sa constante apparente d'association est égale à $5.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. L'unité fonctionnelle de l'ATPase est formé d'un dimère de deux chaînes polypeptidiques ayant une structure primaire identique (TENU et coll., 1978).

2 - La fraction lipidique membranaire

La fraction lipidique de la membrane du RS est comprise entre 22 et 45 % de son poids sec (MARTONOSI, 1964). Sa composition faible en cholestérol (4 % comparée aux 25 % des fantômes de globules rouges, INESI, 1972) ainsi que le degré élevé de lipides non saturés (INESI, 1972) suggèrent que la membrane du RS est une membrane fluide.

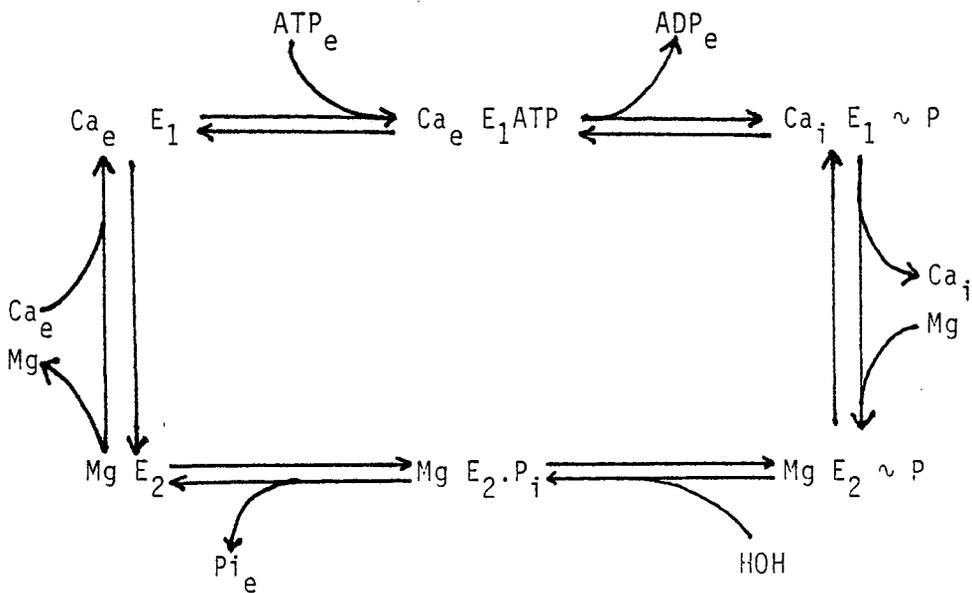
3 - La calséquestrine

Une protéine différente de l'ATPase calcique et isolée à partir du RS a été mise en évidence par Mc LENNAN et WONG (1971). Cette protéine a un poids moléculaire de 44 000 et une capacité très élevée à fixer le calcium (43 mol/mol). La constante de dissociation apparente est de 4.10^{-5} M. Elle est située à l'intérieur des vésicules isolées du RS (Mc LENNAN et WONG, 1971) et l'ATP n'est pas nécessaire à cette fixation. Cette protéine permet le stockage d'une quantité importante d'ions calcium tout en maintenant une activité calcique intraréticulaire relativement faible.

4 - Fonctionnement de l'ATPase calcique

L'ATPase calcique nécessite pour son fonctionnement la présence d'ATP et de magnésium (HASSELBACH et MAKINOSE, 1961 ; EBASHI et LIPMAN, 1962). Dans ces conditions, le calcium est transporté contre un gradient de concentration à raison de 2 ions Ca^{++} par molécule d'Adénosine-Tri-Phosphate hydrolysée (WEBER, 1966) excepté aux basses températures pour lesquelles 1 seul ion Ca^{++} est couplé à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (SUMIDA et TONOMURA, 1974 ; IKEMOTO, 1975 ; HASSELBACH, 1981). Ce système est très spécifique du calcium. Sur des vésicules isolées l'ATP n'agit que sur la face externe et l'ADP est également relâché à la face externe. Le phosphate inorganique, par contre, semble être libéré à l'intérieur des vésicules et se retrouve secondairement à l'extérieur grâce à une fuite rapide.

Le schéma des réactions biochimiques est le suivant (TADA et KATZ, 1982) :



où E_1 et E_2 représentent les deux états différents de l'ATPase. i et e indiquent respectivement l'intérieur et l'extérieur de la membrane du RS. $E_1 P$ est l'intermédiaire phosphorylé à haute affinité calcique alors que $E_2 P$ a une basse affinité calcique. $E_1 P$ peut donner son phosphate à l'ADP pour former de l'ATP et est ainsi appelé "ADP-sensitive phosphoenzyme".

De plus, il est établi que, lors de l'hydrolyse de l'ADP, des protons sont produits par la Ca-ATPase (MADEIRA, 1978 ; SOMLYO et coll., 1981).

Lors de cette chaîne de réactions enzymatiques, la quantité de calcium rapidement accumulée sur un muscle squelettique rapide de lapin est proche de 100 à 150 nmol/mg (TAKENAKA et coll., 1982) et le maximum de calcium transporté atteint 110 à 220 nmoles/mg protéine (WEBER et coll., 1966 ; INESI, 1971 ; WEBER, 1971) ou encore 0.05 M (HASSELBACH, 1964).

Une fois cette concentration intravésiculaire atteinte, le transport calcique est inhibé (WEBER et coll., 1966 ; INESI, 1971 ; WEBER, 1971) même si la concentration calcique extravésiculaire est suffisante pour activer le transport.

Trois facteurs sont impliqués dans la limitation des niveaux maxima de Ca accumulés dans le RS.

- la concentration extraréticulaire (WEBER et coll., 1966 ; WEBER, 1971). En effet, l'activité ATPasique augmente pour des valeurs de $pCa > 7$ à $pCa 5$; puis diminue pour des pCa inférieures à 5 (WEBER, 1971). Cette diminution serait due à une inhibition allostérique (KALBITZER et coll., 1978).

- la vitesse de la fuite passive de calcium (JOHNSON et INESI, 1969).

- la concentration calcique intravésiculaire (WEBER et coll., 1966 ; INESI, 1971 ; WEBER, 1971).

Notons ici qu'il existe une compétition entre les ions H^+ et Ca^{++} au niveau de la fixation sur la Ca-ATPase (HILL et INESI, 1982) et que cette compétition est dirigée vers les sites spécifiques dont l'occupation par le calcium est absolument nécessaire à l'activation enzymatique (INESI et HILL, 1983).

En conclusion, le RS a la propriété de capter les ions Ca^{++} grâce à l'ATPase calcique et celle de stocker ces mêmes ions Ca^{++} grâce à la calséquestrine.

IV - DEVELOPPEMENT DE LA FORCE MUSCULAIRE PAR LES PROTEINES CONTRACTILES

Le développement de la force au niveau des protéines contractiles est la conséquence d'une chaîne de réactions biochimiques qui en présence de Ca et Mg ATP transforme l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Trois niveaux d'action présentent un intérêt physiologique :

1 - La fixation du calcium sur la troponine C permettant l'interaction actine-myosine.

2 - Le développement de la force par les ponts de la myosine.

3 - L'activité ATPasique de la tête S_1 de la myosine.

A - Fixation du calcium sur la troponine C

1 - Affinité des sites pour le calcium

La fixation des ions calcium sur des sites de la troponine C est, nous l'avons vu plus haut, une condition nécessaire au développement de la force musculaire. Elle permet de lever l'effet inhibiteur de la troponine I sur l'interaction actine-myosine.

La troponine C présente deux paires de sites calciques par molécule. Une paire de sites est spécifique du calcium et présente une constante

d'association apparente égale à $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (POTTER et GERGELY, 1975). L'autre paire de sites fixe de façon compétitive soit le calcium soit le magnésium et présente une constante d'association apparente pour le calcium plus élevée que celle des sites spécifiques puisqu'elle est égale à $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (POTTER et GERGELY, 1975). La constante d'association apparente pour le magnésium est égale à $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (POTTER et GERGELY, 1975). D'autre part, une paire de sites spécifique des ions Mg^{++} est présente.

2 - Facteurs influençant l'affinité des sites calciques

Lors de l'établissement de complexes de rigor entre l'actine et la myosine (milieu de concentration en ATP faible) l'affinité d'une paire de sites calciques est augmentée (BREMEL et WEBER, 1972 ; GODT, 1974) ainsi que lors de la contraction musculaire en présence d'ATP (SOLARO et coll., 1976). Cette dernière propriété amena FUCHS et BAYUK (1976) à conclure à la nécessité d'étudier l'affinité des sites calciques de la troponine sur une machinerie contractile comportant l'ensemble des molécules (voir le paragraphe structure) plutôt que sur des sous-unités isolées de la troponine C. Ces auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle l'affinité des ions Ca pour la troponine est une propriété dynamique qui est modifiée lors de l'attachement et du détachement périodique des ponts observés durant une contraction musculaire. Cette idée semble se confirmer puisque EKELUND et EDMAN (1982) rapportent que lors du raccourcissement du sarcomère l'interaction conduit à une diminution de la fixation calcique sur la troponine. De même, RIDGWAY et coll. (1983) sur la fibre musculaire intacte et pelée de Balane montrent que l'augmentation du niveau de force augmente la sensibilité calcique c'est-à-dire que la contraction module la sensibilité calcique. RIDGWAY et GORDON (1984) suggèrent que la fixation calcique sur

la troponine est sensible soit à la longueur du muscle soit à la force musculaire.

D'autres facteurs modifient l'affinité du calcium pour la troponine. C'est le cas notamment de la température et de la force ionique. En effet, une baisse de température de 22°C à 4°C diminue l'affinité des sites récepteurs calciques de la troponine (GODT et LINDLEY, 1982) et une diminution de la force ionique l'augmente (BRANDT et coll., 1974 ; SOLARO et coll., 1976). D'autre part, l'environnement ionique est d'une grande importance puisque les ions H^+ , K^+ , Mg^{++} inhibent de façon compétitive la fixation du calcium (ASHLEY et MOISESCU, 1977).

Les résultats concernant les variations de l'affinité calcique par l'évaluation de la concentration calcique (pCa) pour laquelle la tension mécanique est égale à 50 % de la tension maximale que la fibre peut développer (P_0) sont sujet à caution. En effet, le déplacement de la courbe tension - pCa le long de l'axe des abscisses ne traduit pas uniquement une variation de l'affinité des sites calciques de la troponine. Ce déplacement pourrait être le résultat d'une relation existant entre le temps que met un pont pour effectuer le cycle d'attachement, détachement et le temps durant lequel le calcium reste fixé sur la troponine C. Si la vitesse avec laquelle le pont effectue ce cycle est diminuée, une plus petite fraction des sites de la troponine C doivent être occupés pour garder une certaine fraction des ponts actifs (BRANDT et coll., 1982).

B - Développement de la force musculaire par la création des ponts

D'après les résultats de HUXLEY et HANSON (1954) et de HUXLEY et

NIEDERGERKE (1954), la contraction musculaire résulte du glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais (Fig. 10). La longueur de chaque filament ne changeant pas, le glissement se fait par l'intermédiaire de "ponts" (cross-bridges) qui se forment cycliquement entre les 2 types de filaments pendant la contraction. C'est la théorie des filaments glissants ou encore "sliding filaments/cross bridges theory".

L'interaction entre l'actine et la myosine par le biais de ponts produit outre la contraction, une augmentation en raideur de la fibre musculaire que l'on pense être proportionnelle au nombre de ponts formés (GORDON et coll., 1966 ; HUXLEY et SIMMONS, 1973). Ceci est également vrai sur les fibres mécaniquement pelées de Grenouille (HERZIG et coll., 1981). Cette propriété sous entend que la force développée par chaque pont est identique pour des concentrations variées de calcium. Il s'ensuit donc que l'augmentation de la raideur proportionnelle à l'augmentation de la concentration calcique reflète une augmentation du nombre de ponts attachés (HERZIG et coll. 1981 ; PFITZER et coll., 1982). Ces observations sont en accord avec l'idée selon laquelle l'activation calcique signifie un recrutement d'un nombre plus important de ponts (PODOLSKY et TEICHHOLZ, 1970 ; GULATI et PODOLSKY, 1978 ; RÜEGG et coll., 1979).

Cependant, quelques rapports vont à l'encontre de cette proportionnalité entre le développement de la contraction et l'augmentation du nombre de ponts. En effet CECCHI et coll. (1981, 1982) montrent, sur les fibres musculaires de Grenouille, que l'augmentation de la raideur précède le développement de la force. D'après ces auteurs ce résultat serait dû à

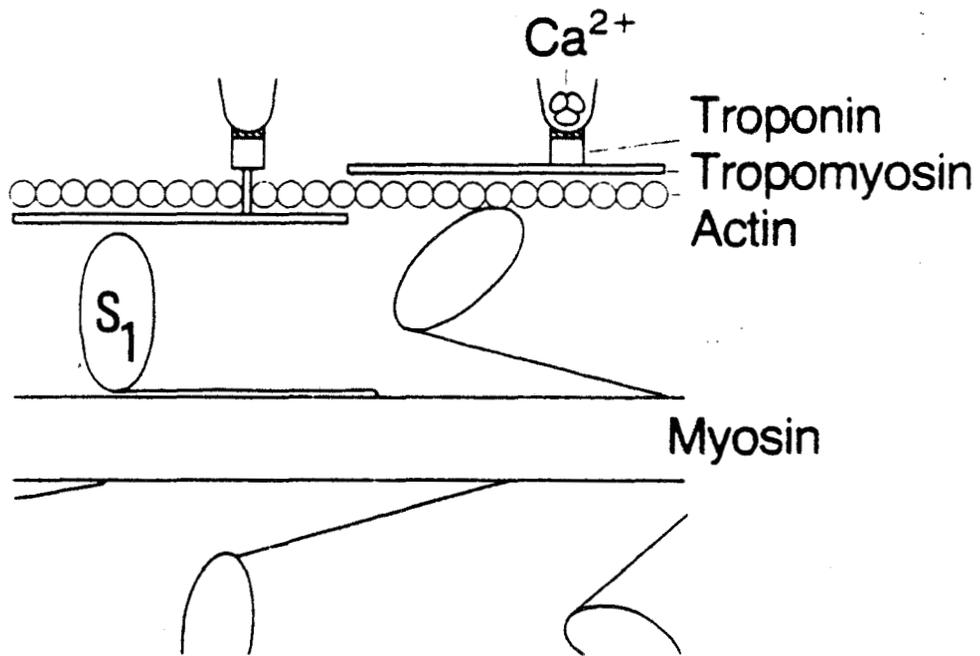


Figure 10 : Représentation schématique sur une fibre musculaire striée des interactions entre l'actine et la myosine.

à gauche : absence d'interaction entre l'actine et la tête globulaire de la myosine (sous unité S₁ - HMM) en absence de calcium

à droite : interaction entre l'actine et la tête globulaire de la myosine lorsque les ions calcium sont fixés sur la troponine.

Notez la modification de la position de la tropomyosine lorsque le calcium est présent.

(D'après HERZIG, 1984).

l'existence de ponts de longue vie entre l'attachement et la genèse de la force. D'après KAWAI et BRANDT (1976) sur les fibres pelées d'Ecrevisse la raideur n'est pas unique mais dépend de l'état du muscle avant la rigor.

Depuis quelques années, des critiques concernant la théorie des filaments glissants apparaissent dans la littérature (POLLACK, 1983 ; HOYLE, 1983). En effet, l'une des plus grandes difficultés à l'heure actuelle pour accepter la théorie des filaments glissants est la situation structurale de la partie élastique des protéines contractiles.

L'élément élastique serait situé soit dans les ponts eux-mêmes (HERTZIG et coll., 1981, sur les fibres musculaires pelées de Grenouille, TAWADA et KIMURA, 1984, sur les fibres glycérolées de psoas de Lapin). SUZUKI et SUGI (1983) ont montré sur les fibres glycérolées de psoas de Lapin que lors d'un étirement (20 %) la zone H et la bande I s'étirent alors que l'importance du recouvrement entre les filaments épais et fins et l'épaisseur de la ligne Z ne sont pas modifiées. Ce résultat montre clairement que les filaments fins et épais sont extensibles. L'élément élastique n'est pas la portion S_2 de la méromyosine lourde (KIMURA et TAWADA, 1984, sur les fibres glycérolées du muscle psoas de Lapin).

C - Activité ATPasique de la myosine

Le substrat de la réaction enzymatique est le Mg ATP (REUBEN et coll., 1971) et la force musculaire développée dépend de la concentration en Mg ATP. Dans le cadre de ce paragraphe nous nous contenterons de

rapporter des résultats obtenus sur des fibres musculaires de Crustacés. Contrairement aux fibres musculaires du psoas de Lapin, la force isométrique est une fonction monophasique de la concentration en Mg ATP et non une relation en cloche (KAWAI et BRANDT, 1977, sur les fibres mécaniquement pelées d'Ecrevisse ; CHAEN et SUGI, 1982, sur les fibres glycolées de Crabe). Dans la mesure où d'après HUXLEY (1957)

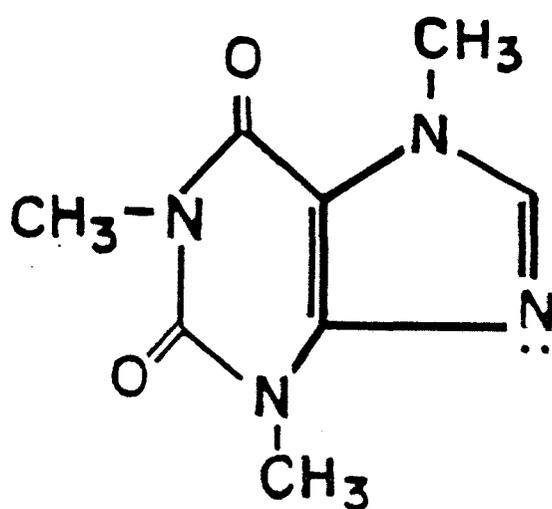
$$P = \frac{f}{f + g}$$

où P représente l'amplitude de la tension isométrique, f la vitesse de formation des ponts et g la vitesse de détachement, la diminution de P, sur le muscle psoas de Lapin, pour des concentrations élevées en Mg ATP est due à une augmentation de g (CHAEN et coll., 1981). La relation monophasique entre la tension isométrique et la concentration en Mg ATP sur les fibres musculaires de Crustacés peut être due soit à une valeur de g beaucoup plus faible que celle de f (CHAEN et SUGI, 1982), soit à une augmentation proportionnelle de f et de g (KAWAI et BRANDT, 1977). Sur le Crabe, l'activité ATPasique est maximale pour une concentration en Mg ATP égale à 10^{-4} M et la force isométrique est maximale pour une concentration en Mg ATP de $2.3 \cdot 10^{-3}$ M (CHAEN et SUGI, 1982).

V - STRUCTURE, SITES et MODES d'ACTION DE LA CAFEINE

La partie expérimentale de ce travail a nécessité l'utilisation fréquente d'une drogue : la caféine qui est un outil important utilisé en physiologie musculaire afin d'étudier les différents aspects du couplage excitation-contraction. Il nous est donc apparu nécessaire de faire état des travaux spécifiques à l'étude des sites et modes d'action de cette molécule.

En général, la caféine augmente l'amplitude de la secousse musculaire et induit une contracture sur une grande variété de muscles squelettiques et cardiaques. Cependant, en fonction des conditions expérimentales, la contraction enregistrée sur des muscles cardiaques peut être diminuée par la caféine (SANDOW et BRUST, 1966 ; BIANCHI, 1968 ; LÜTTGAU et OETLIKER, 1968). Sa formule chimique est la suivante (BIANCHI, 1968)



Caffeine

pK_a = 0.8

et ses sites et modes d'actions sont multiples.

Ses effets sur la membrane sarcoplasmique sont tels qu'elle augmente l'influx calcique induit par une dépolarisation membranaire (BIANCHI, 1968 ; NIEDERGERKE et PAGE, 1981) ainsi que la perméabilité calcique de repos comme cela a été décrit sur les fibres musculaires de Vertébrés (BIANCHI, 1961) et suggéré par CHIARANDINI et coll. (1970) sur les fibres musculaires d'Ecrevisse.

Outre ses effets sur la membrane sarcolemmique, la caféine agit également après pénétration dans la cellule (BIANCHI, 1962), sur la membrane

du réticulum sarcoplasmique. Son action est double : elle stimule le largage calcique à partir du RS (FRANK, 1960) et inhibe la capture du calcium par l'ATPase calcique située dans la membrane du RS (WEBER et HERZ, 1968 ; FABIATO et FABIATO, 1972 ; ENDO, 1977 ; STEPHENSON, 1981 ; POLEDNA et MORAD, 1983 ; MÉSZÁROS et IKEMOTO, 1985). De plus, deux effets distincts de la caféine sur l'ATPase calcique ont été décrits en fonction de la concentration en ATP (WEBER, 1968). En présence de concentrations élevées d'ATP, la caféine diminue le couplage entre l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase calcique et le transport de calcium dans la lumière du RS c'est-à-dire qu'elle inhibe le transport calcique sans inhiber la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP ou bien qu'elle stimule l'activité ATPasique sans stimuler le transport calcique. En présence de faibles concentrations d'ATP la caféine inhibe l'activité ATPasique sans modifier la vitesse du transport calcique.

La stimulation du largage calcique associée à l'inhibition du transport calcique dans le RS pourrait expliquer les contractions caféiniques observées sur les fibres musculaires intactes. Notons ici que le calcium largué par la caféine n'a pas pour origine le calcium stocké dans les mitochondries (DE LUCA et ENGSTROM, 1961 ; VASINGTON et MURPHY, 1963).

Enfin, par inhibition de la phosphodiesterase elle empêche l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate cyclique (SUTHERLAND et RALL, 1958) et par conséquent altère l'état de phosphorylation des protéines contractiles et la sensibilité calcique des protéines régulatrices (WENDT et STEPHENSON, 1983).

WATER

AT

WATER

I - MATERIEL BIOLOGIQUE.

A - Choix de la préparation.

B - Préparation du matériel biologique.

1 - Préparation des fibres intactes.

2 - Préparation des fibres pelées.

a - Isolement de la fibre.

b - Pelage de la fibre isolée.

C - Montage dans les cuves expérimentales.

1 - Cuve expérimentale à double partition de saccharose pour fibre intacte.

2 - Cuve expérimentale pour fibre pelée.

II - MATERIEL DE MESURE ET D'ENREGISTREMENT.

A - Technique de la double partition de saccharose.

1 - Mesure du courant de membrane en potentiel imposé.

2 - Limites de la technique du potentiel imposé et propriétés inhérentes au "sucrose - gap".

3 - Enregistrement simultané de la contraction musculaire.

B - Techniques utilisées sur les fibres pelées.

1 - Mesure de la tension mécanique.

2 - Mesure de la concentration calcique.

a - Principe.

b - Appareillage.

III - SOLUTIONS.A - Solutions utilisées dans les expériences avec fibre intacte.

- 1 - Eau de mer artificielle: solution physiologique externe de référence, ASW.
- 2 - Autres solutions physiologiques externes.
- 3 - Solutions avec inhibiteurs de perméabilité.
- 4 - Solutions avec drogues pharmacologiques.

B - Solutions utilisées dans les expériences avec fibre pelée.

- 1 - Solutions mères.
- 2 - Solutions utilisées lors de l'expérimentation.
 - a - Solutions couramment utilisées.
 - b - Solutions utilisées lors de l'établissement des caractéristiques générales des fibres musculaires.
 - c - Solutions utilisées pour la mise en évidence d'un largage calcique induit par des cations divalents.
 - d - Solutions utilisées pour l'étude du rôle de l'ADP dans le mécanisme de libération calcique et pour le contrôle d'un effet spécifique sur le RS.
 - e - Solutions utilisées pour l'étude des effets des inhibiteurs potassiques sur la perméabilité calcique du RS et les protéines contractiles.
 - f - Solutions arsenazo.

IV - LECTURE DES TRACES.

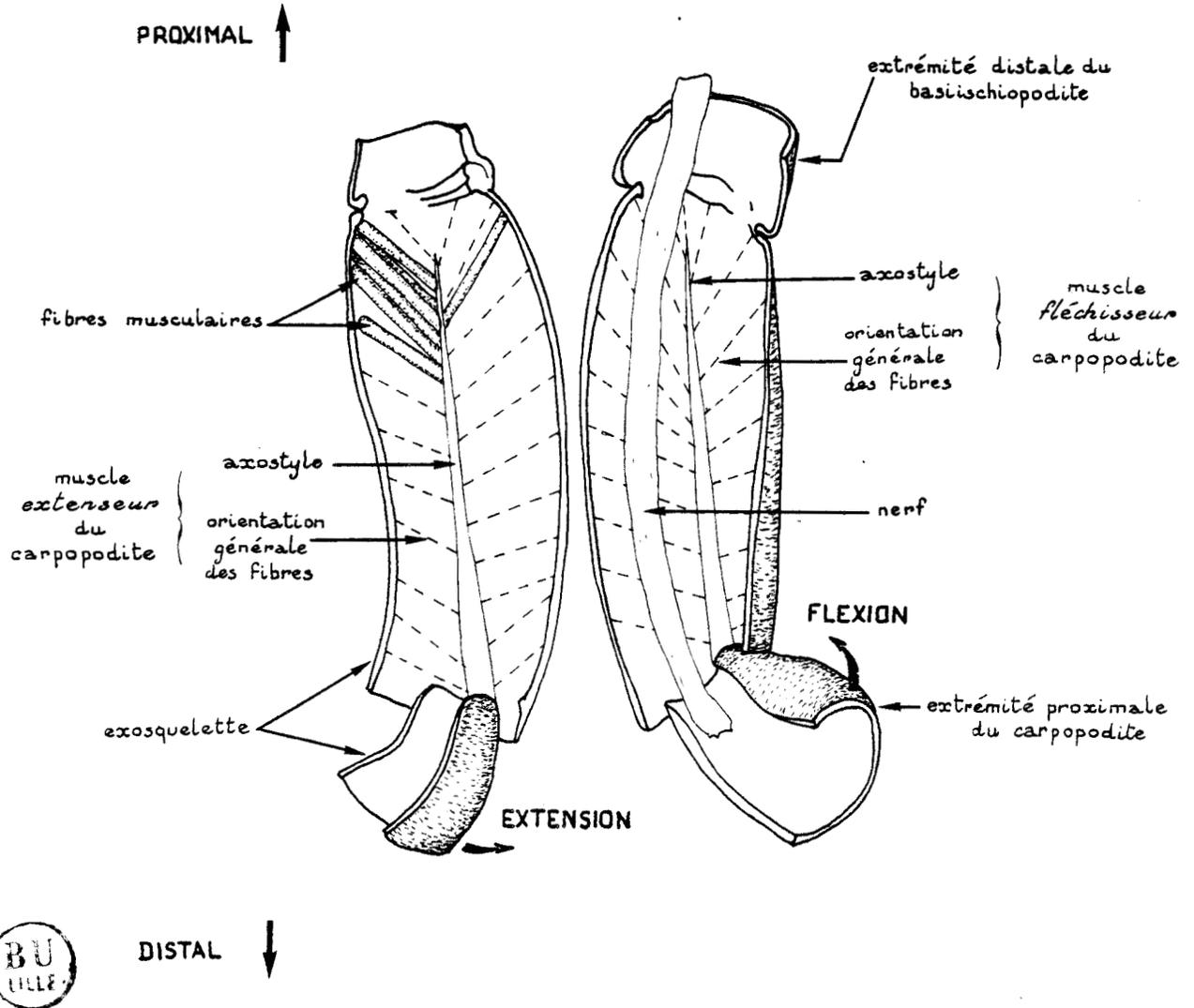
- A - Courants membranaires et contractions enregistrés sur fibres intactes.
- B - Enregistrement des contractions sur fibres pelées.
- C - Contraction et variation d'absorption lumineuse enregistrées sur les fibres musculaires pelées.

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

A. Choix de la préparation

Actuellement, l'un des supports de la recherche physiologique pour tenter de cerner le processus de couplage excitation-contraction est la fibre musculaire d'Arthropodes et plus particulièrement de Crustacés.

Les fibres musculaires de Crustacés sont caractérisées par leur grande dimension qui facilite notamment leur isolement, l'implantation de microélectrodes et dans l'étude qui nous intéresse rend possible la microdissection du sarcolemme. En outre, les fibres musculaires de Crustacés sont des *structures calciques*. En effet, si le calcium est indispensable au développement de la tension musculaire, que ce soit chez les Vertébrés ou chez les Invertébrés, la dépolarisation membranaire des fibres musculaires de Crustacés est imputable à un flux entrant de *calcium* (structures dites calciques) contrairement aux fibres de Mammifères dont les phénomènes électriques membranaires sont caractérisés par un courant essentiellement sodique (structures dites sodiques). Les mouvements calciques sarcolemmiques et intracellulaires sont donc d'une grande importance sur ces préparations qui constituent bien un matériel de choix pour l'étude du couplage excitation-contraction. C'est pourquoi nous avons choisi d'effectuer notre travail sur les fibres musculaires des pattes marcheuses du crabe Carcinus maenas, prélevées dans le méropodite au niveau de l'extrémité proximale du muscle extenseur du carpopodite (Fig. 11).



ORGANISATION MUSCULAIRE DU MEROPODITE DROIT
DE *CARCINUS MAENAS*

Figure 11 : Schéma de l'organisation musculaire du méropodite droit de *Carcinus maenas*.

(D'après LÉCONTE, 1985).

B. Préparation du matériel biologique

La préparation du matériel biologique est différente selon le type d'expérience à effectuer. Certaines nécessitent l'utilisation de fibres intactes, d'autres de fibres pelées.

1. Préparation des fibres intactes

Les fibres sont isolées sous loupe binoculaire (Wild Leitz, Rueil-Malmaison, France) dans une solution d'eau de mer artificielle (Artificial Sea Water, ASW, FATT et KATZ, 1953). La fibre choisie après ouverture longitudinale de la carapace du méropodite (Fig. 11) est isolée des fibres voisines par section des filets nerveux et, si nécessaire, du tissu conjonctif qui l'encombre. A l'une des extrémités un carré de carapace est découpé et à l'autre extrémité une portion d'axostyle est préservée afin d'isoler entièrement la fibre. La longueur des fibres ainsi obtenues varie de 4 à 9 mm et leur diamètre est compris entre 150 et 350 μm . Les fibres musculaires de Crabe sont le plus souvent elliptiques et les valeurs de diamètre données correspondent à la mesure du grand diamètre.

Une fois isolée, la fibre est amenée dans la cuve expérimentale à double partition de saccharose (voir Fig. 12) dans une goutte d'eau de mer déposée sur une lamelle de verre.

Les fibres intactes seront utilisées pour l'enregistrement simultané des courants ioniques membranaires et de la contraction.

2. Préparation des fibres pelées

Deux phases peuvent être distinguées :

- isolement de la fibre
- pelage de la fibre isolée.

a - Isolement de la fibre

L'isolement de la fibre consiste en la préparation d'une fibre intacte telle qu'elle a été décrite dans le paragraphe 1 ci-dessus.

b - Pelage de la fibre isolée

- Données théoriques :

Cette opération consiste à ôter le sarcolemme d'une fibre préalablement isolée et intacte. Elle peut être réalisée chimiquement par l'*EGTA*[‡] sur les coeurs de Grenouille et de Lapin (WINEGRAD, 1971), sur les fibres musculaires squelettiques humaines (WOOD et coll., 1975 ; MOUNIER et GOBLET, 1983), de Singe (GOBLET et MOUNIER, résultats non publiés), de Lapin (SORENSEN et coll., 1980) et de Rat (GOBLET et coll., 1984) et par la *saponine* sur les fibres musculaires lisses (ENDO et coll., 1982 ; SAIDA, 1982). Le pelage peut également être effectué mécaniquement par microdissection. NATORI (1954) fut le premier à effectuer ce type de microdissection qui fut ultérieurement amélioré par REUBEN et coll. (1967, 1971) sur la fibre isolée d'Ecrevisse.

[‡] *EGTA* : Ethylene Glycol bis (amino ethyl ether) N-N' Tetraacetic Acid.

L'intérêt du pelage repose sur le fait qu'il rompt la membrane sarcolemmique tout en maintenant les protéines contractiles et les membranes internes intactes (STEPHENSON, 1981). Le système contractile peut être contrôlé directement et de ce fait la relation entre la force développée et la concentration calcique myoplasmique peut être déterminée (HELLMAN et PODOLSKY, 1969 ; BRANDT et coll., 1972). De plus les mouvements nets de calcium entre le réticulum sarcoplasmique et le myoplasme peuvent être évalués par la force développée (FORD et PODOLSKY, 1970 ; ENDO, 1975 ; STEPHENSON et PODOLSKY, 1977). Notons que contrairement aux fibres chimiquement pelées, les fibres mécaniquement pelées présentent un système tubulaire clos (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967 ; ENDO et NAKAJIMA, 1973 ; STEPHENSON et PODOLSKY, 1977).

- Technique du pelage mécanique

Une fois isolée, la fibre est transférée dans une cuve de plexiglas surélevée de façon à permettre son éclairage par transparence. Le pelage mécanique est effectué selon la technique de REUBEN et coll. (1971). La fibre baigne dans une solution saline R ou relaxante à forte concentration en potassium et pratiquement dépourvue de calcium grâce à un chélateur de cet ion : l'EGTA (concentration calcique inférieure à 10^{-8} M).

Le transfert de la fibre dans une solution de concentration potassique élevée induit le développement d'une contraction maximale mais transitoire. Lorsque la fibre est relâchée, le sarcolemme est découpé sur tout le pourtour à l'une des extrémités de la fibre à l'aide d'une aiguille fine

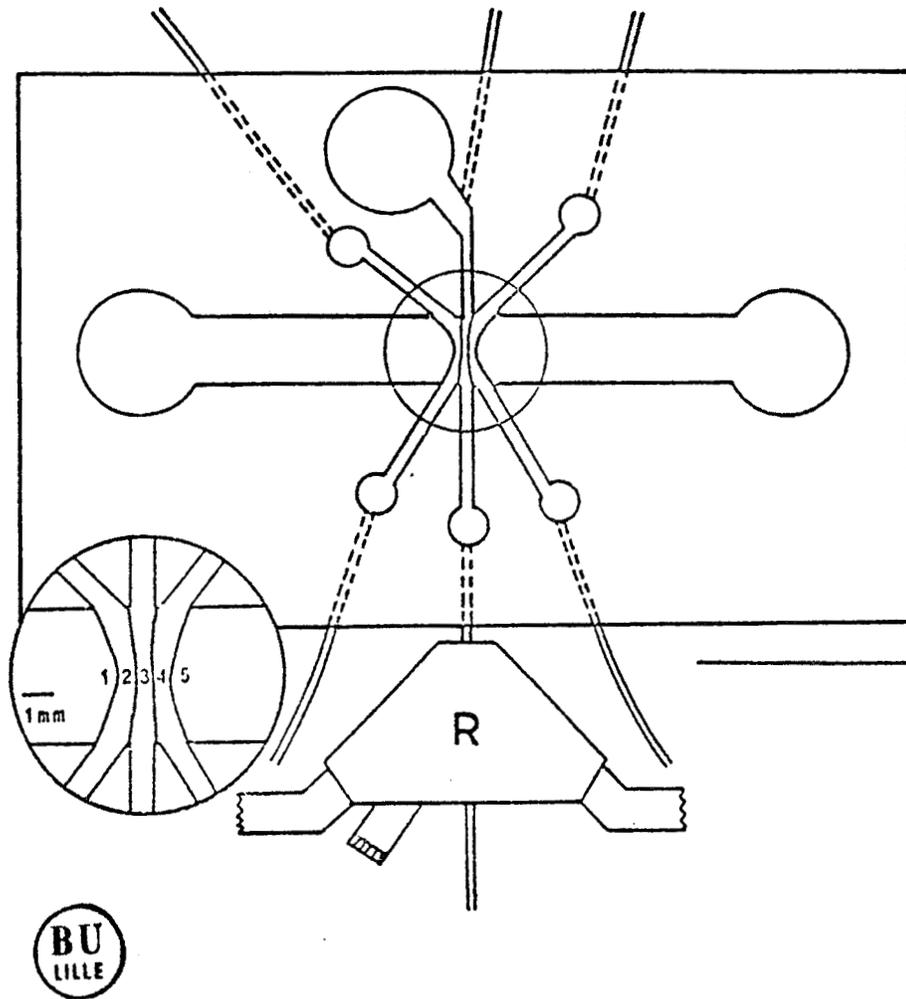


Figure 12 : Représentation schématique de la cuve expérimentale du poste d'expérimentation en double partition de saccharose.
 Dans le médaillon la partie centrale a été agrandie.
 1 et 5 : compartiments de référence contenant généralement du KCl isotonique
 2 et 4 : compartiments saccharose, largeur 400 μm environ
 3 : compartiment test, largeur 200 μm environ.
 (D'après MOUNIER, 1975).

et recourbée. Une pince nous permet alors de tirer sur le sarcolemme, dénudant la fibre d'environ 90 % de sa surface.

C. Montage dans les cuves expérimentales

Les cuves expérimentales utilisées pour les fibres intactes et les fibres pelées sont différentes.

1. Cuve expérimentale à double partition de saccharose pour fibre intacte (Fig. 12)

La fibre est installée dans une cuve à cinq compartiments comparable à celle décrite par ROUGIER et coll. (1968) pour le trabécule sino-auriculaire du coeur de Grenouille, ultérieurement adaptée aux fibres musculaires de Crabe (MOUNIER et VASSORT, 1975 a), de telle façon que cette fibre s'étende sur les cinq compartiments. Ces compartiments sont :

- le compartiment central 3 constituant le compartiment test dans lequel baigne la portion de fibre étudiée et où circulent le liquide physiologique ou les différentes solutions à tester. A l'entrée de ce compartiment est situé un robinet spécial (KILB et STÄMPFLI, 1955) dont l'utilisation permet, du fait du faible volume du compartiment, un changement complet de solution en une fraction de seconde.

- compartiments 2 et 4, d'une largeur d'environ 300 à 400 μm , dans lesquels circule une solution de saccharose légèrement hypertonique (1,1 X la tonicité normale).

- compartiments 1 et 5 ou compartiments latéraux remplis d'une solution ionique similaire au milieu interne. Cette solution stagne dans ces 2 compartiments.

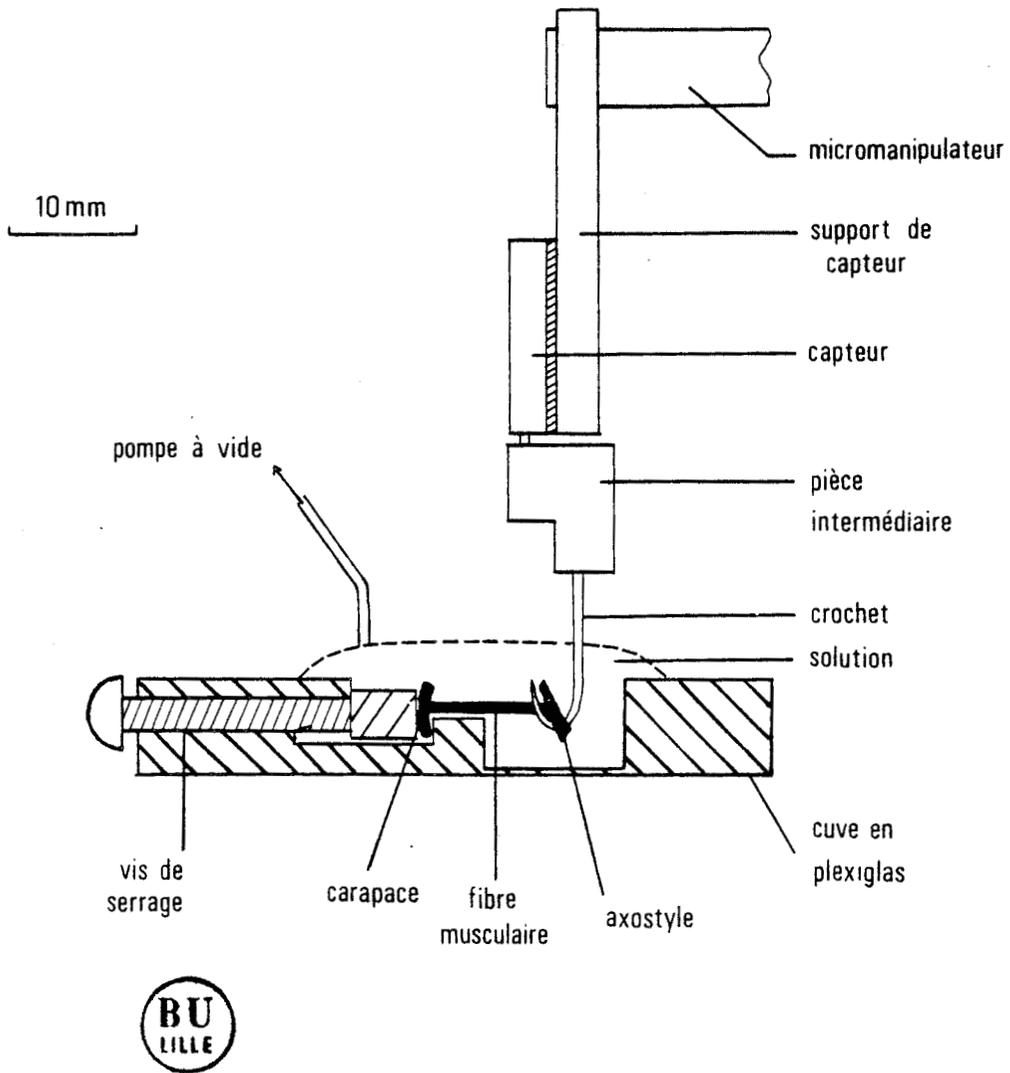


Figure 13 : Représentation schématique du dispositif de montage d'une fibre musculaire pelée.

Ces différents compartiments sont séparés par de fines cloisons dont la tranche est recouverte d'un film de vaseline afin de créer une bonne étanchéité et d'éviter une hyperpolarisation de la fibre comme nous le verrons ensuite (limites de la technique).

2. Cuve expérimentale pour fibre pelée (Fig. 13)

Lorsque la fibre est pelée, elle est montée dans la cuve expérimentale contenant de la solution relaxante. A une extrémité, le petit carré de carapace conservé lors de la dissection est serré par une butée au moyen d'une vis. A l'autre extrémité le bout d'axostyle retient la fibre au crochet relié au capteur de force. Ce dernier est monté sur un micromanipulateur qui permet de régler la longueur de la fibre à 120 % de la longueur de repos (L_0). Il est en effet démontré qu'une fibre musculaire développe une tension maximale pour un étirement minimum de 20 % de sa longueur de repos (relation Force-Longueur).

Un système d'aspiration permet de changer rapidement les solutions environnant la fibre tout en maintenant le niveau du liquide constant (Fig. 13). En effet, une variation de niveau du liquide est susceptible de modifier la tension exercée sur le capteur et par conséquent le niveau de base de l'enregistrement.

Pour les expériences faisant appel à la technique colorimétrique (Arsenazo III), la cuve est placée dans le champ d'un microscope à inversion (Olympus).

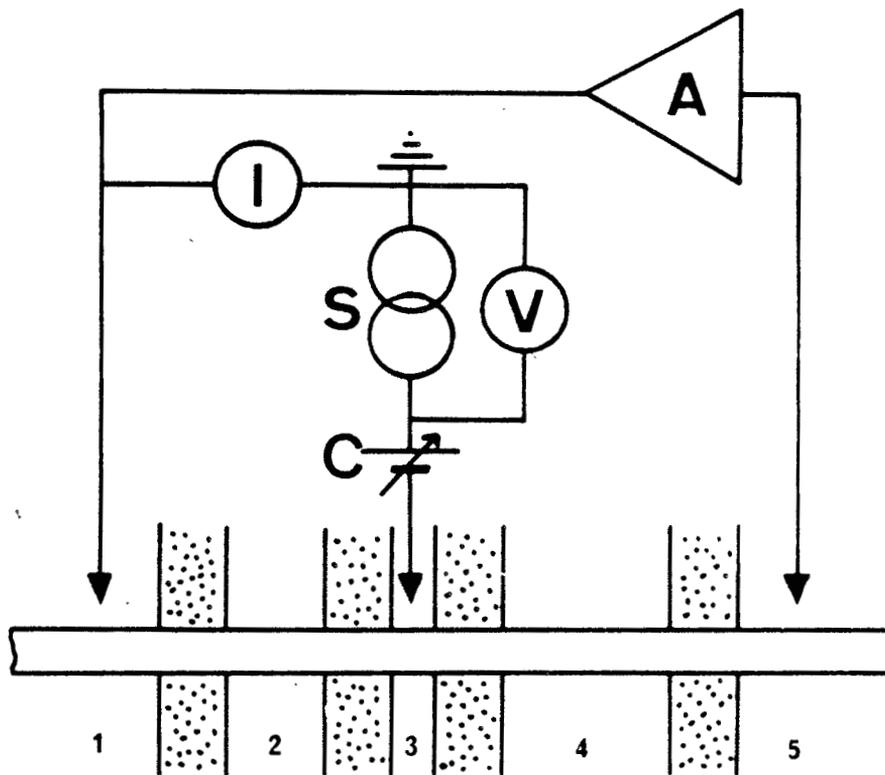


Figure 14 : Dispositif expérimental de la technique de double partition de saccharose : mesure en potentiel imposé.

1 et 5 : compartiments de référence

2 et 4 : compartiments de saccharose

3 : compartiment test

A : amplificateur à contre réaction totale externe

C : source électrique pour la compensation des dissymétries d'électrodes et de potentiel

I : oscilloscope cathodique (mesure du courant)

V : oscilloscope cathodique (mesure du potentiel)

S : stimulation

(D'après ROUGIER et coll. 1968, modifié)

II - MATERIEL DE MESURE ET D'ENREGISTREMENT

A. La technique de la double partition de saccharose

Cette méthode, proposée par STÄMPFLI (1954), est dérivée de celle de l'"air gap" (TASAKI, 1939) et est susceptible d'être appliquée à toute structure excitable.

Elle consiste à laver continuellement une portion de fibre avec une solution de saccharose isotonique : méthode de la double partition de saccharose ou du "sucrose gap". La résistance spécifique du saccharose est égale à $10^5 \Omega \cdot \text{cm}$.

Le lavage de la fibre par deux écoulements de saccharose permet d'isoler électriquement un "noeud artificiel" comparable au noeud de Ranvier. Ce "noeud artificiel" a une longueur correspondant à peu près à la largeur du compartiment test, soit $100 \mu\text{m}$ lorsque les cloisons de vaseline sont réalisées. Cette valeur est très inférieure à la constante d'espace de la fibre au repos comprise entre $700 \mu\text{m}$ et $1400 \mu\text{m}$, valeur déterminée par microélectrodes (FATT et KATZ, 1953 ; MOUNIER, 1970).

Cette technique permet de mesurer le potentiel de membrane dans les conditions de courant imposé et le courant membranaire dans les conditions de potentiel imposé. Nous n'aborderons ici que le dispositif de mesure du courant membranaire car seules les conditions de potentiel imposé ont été utilisées dans les expériences rapportées dans le chapitre "Résultats".

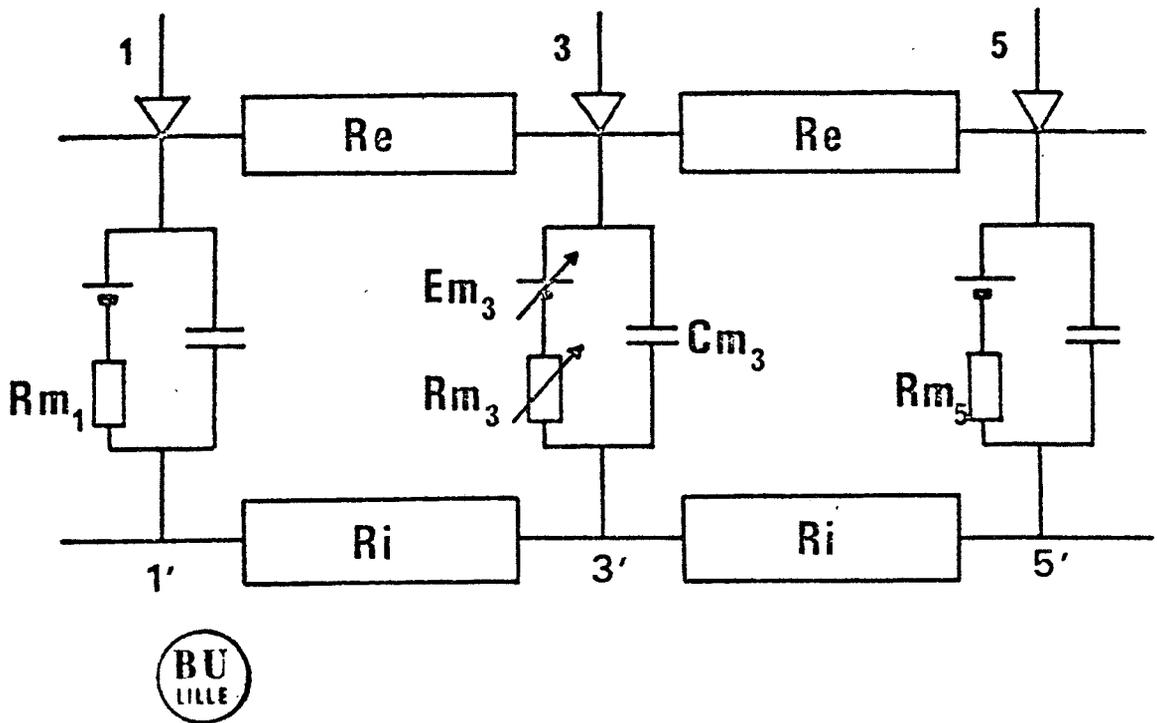


Figure 15 : Diagramme du circuit électrique équivalent de la préparation montée dans le dispositif à double partition de saccharose.

1-3-5 : Electrodes des compartiments correspondants

R_e : Résistance extracellulaire

R_i : Résistance intracellulaire

E_{m3} , R_{m3} , C_{m3} : respectivement, le potentiel, la résistance, la capacité de la membrane de l'étranglement artificiel.

(D'après ROUGIER, 1968)

1. Mesure du courant de membrane en potentiel imposé (Fig. 14).

Pour les mesures en potentiel imposé, l'amplificateur est connecté entre les points 1 et 5. La différence de potentiel délivrée par le stimulateur S est appliquée entre le compartiment test 3 et la terre. Le point 3' étant au potentiel de terre, la membrane dans ce compartiment test (3) est portée à un potentiel égal à celui délivré par le stimulateur pourvu que la résistance en série constituée par l'électrode et le liquide physiologique soit assez faible.

L'amplificateur fournit un courant pour maintenir la membrane au potentiel choisi, ce courant est directement proportionnel au potentiel délivré par la sortie de l'amplificateur divisé par les résistances en série R_{m1} et R_i (1'-3') (Fig. 15).

2. Limites de la technique du potentiel imposé, et propriétés inhérentes au "sucrose-gap".

L'essentiel de cette partie technique a été rapportée par MOUNIER et VASSORT (1979). Afin de préciser les termes employés et la technique, le schéma de la technique du potentiel imposé et la représentation des potentiels en des points variés sont reportés à la figure 16. Il faut auparavant noter que le potentiel V appliqué dans le compartiment test (B) est égal et opposé au potentiel délivré par le générateur de tension puisque leur somme doit être dans cette technique égale à zéro et que le potentiel membranaire E_m est égal à $E_R + V_m$. Lors du flux de courant,

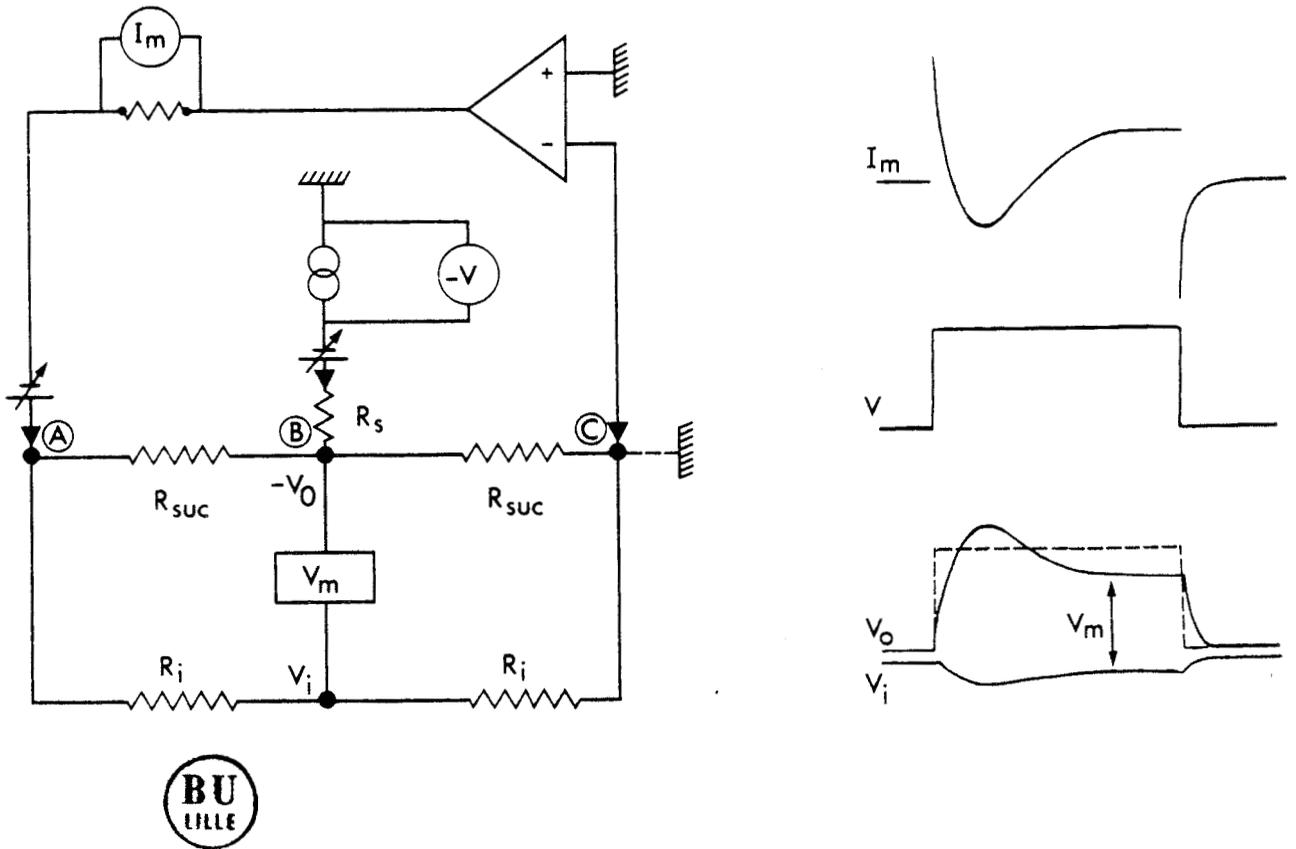


Figure 16 : Représentation schématique du circuit de potentiel imposé et du potentiel en des points variés de ce circuit. Les abréviations sont expliquées dans le texte.

(D'après MOUNIER et VASSORT, 1979)

Le potentiel imposé à la membrane, V_m , à proximité du compartiment contenant le saccharose et isolant le compartiment relié à l'entrée de l'amplificateur (C) diffère du potentiel délivré par le stimulateur, $-V$, par 2 facteurs. Le premier facteur est un facteur commun à toutes les techniques de potentiel imposé : la chute de tension due au passage du courant, I_m , dans les résistances séries, R_S . Le potentiel $-V_0$, appliqué à la face externe de la membrane est donc égal à $-V + R_S I_m$ (I_m sortant est positif). Le second facteur résulte du fait que l'isolement par le compartiment de saccharose entre le compartiment test et le compartiment relié à l'entrée de l'amplificateur n'est pas parfait et qu'un courant passe dans la résistance du saccharose R_{suc} et la résistance interne R_i . Par conséquent, le potentiel appliqué à la membrane V_m est tel que $V_0 = V_m \cdot R_{suc} / (R_{suc} + R_i)$ c'est-à-dire $V_m = (V - R_S I_m) (R_{suc} + R_i) / R_{suc}$ (1).

Le courant de fuite crée également un potentiel, V_i , à la face interne de la membrane qui est égal à $V_m \cdot R_i / (R_{suc} + R_i)$ ou encore en remplaçant V_m par sa valeur obtenue dans l'équation (1)

$V_i = (V - R_S I_m) R_i / R_{suc}$. Ce dernier facteur est d'amplitude limitée, quelques mV, comme l'ont montré les résultats obtenus à l'aide de microélectrodes intracellulaires (MOUNIER, 1975 ; MOUNIER et VASSORT, 1975 b).

En effet, il compense partiellement la perte de potentiel appliqué à la face externe de la membrane quand I_m est sortant ; c'est la situation que l'on observe le plus souvent à cause des courants de fuite importants existant sur les fibres musculaires de Crabe. De plus, l'écoulement des différents liquides crée l'apparition de potentiels de jonction. Ceux-ci se produisent, d'une part lors du changement de solution test à l'interface entre celle-ci et l'électrode au KCl et d'autre part, entre la solution test

et les écoulements de saccharose. Ces différents potentiels, de même qu'une petite dissymétrie entre les potentiels des électrodes au calomel sont compensables à l'aide de piles (voir Figure 16).

Ainsi, lorsque l'on commence une expérience ou 3 à 5 minutes après le changement de solution, le circuit de potentiel imposé est ouvert et les différents potentiels de jonction sont compensés. La compensation est contrôlée plusieurs fois durant l'expérience.

Nous avons vu précédemment qu'il est nécessaire d'utiliser une solution de saccharose dépourvue d'ions afin que le facteur de court-circuit $\frac{R_e}{R_e + R_i}$ tende vers 1. Cependant, celle-ci entraîne parfois une hyperpolarisation membranaire au niveau de l'étranglement pouvant atteindre 60 mV. Pour réduire ce phénomène, des cloisons de vaseline sont placées entre les différentes solutions.

Pour utiliser la technique du "sucrose-gap" dans les meilleurs conditions, il ne suffit pas de choisir la largeur du compartiment test nettement inférieure à la constante d'espace, λ , mais il faut tenir compte du rapport x/λ avec x égal à la largeur du compartiment test. C'est pourquoi, la largeur x , c'est-à-dire la longueur de la portion de fibre soumise à l'expérimentation, a été choisie égale à environ 100 μm (MOUNIER, 1975).

Enfin, l'utilisation d'électrodes externes ne permet pas de mesurer directement la valeur réelle du potentiel de membrane. Quand les différents potentiels de jonctions sont compensés, on admet que le niveau de référence correspond au niveau du potentiel de repos.

3. Enregistrement simultané de la contraction musculaire

La tension, développée par la fibre musculaire, consécutive à une stimulation, est enregistrée dans le compartiment test (3) à l'aide d'une fine aiguille métallique de 3 cm de longueur reliée à un capteur de force composé de deux jauges de contrainte (série 8101, PIXIE). La mesure de la force développée est effectuée en introduisant ces jauges dans deux des branches d'un pont de Wheastone. L'ensemble est relié à un amplificateur puis à l'une des entrées de l'oscilloscope ou d'un enregistreur papier Allcoscript EN 48 (Gould, Lonjumeau, France), afin de visualiser le phénomène. Après passage dans les amplificateurs et filtres, les caractéristiques du signal sont les suivantes : fréquence de résonance 90 Hz, sensibilité 150 mV/10 mg et réponse linéaire jusqu'à 350 mg.

L'aiguille est amenée tangentiellment au centre du noeud artificiel (100 μm) et cette portion de fibre est étirée par l'application d'une prétension avant l'enregistrement des contractions.

L'enregistrement peut être considéré comme isométrique grâce à une bonne fixation de la partie centrale de la fibre par les ponts de vaseline.

La force mesurée a une amplitude et une direction déterminée par la somme vectorielle des forces exercées par les deux demi-portions actives du faisceau. Si l'on admet que les deux forces (F) sont égales, la force résultante (R mesurée) a une direction qui est la bissectrice de l'angle (2α) formé par les deux forces et a une amplitude $R = 2F \cos\alpha$ avec $\alpha = 60^\circ$.

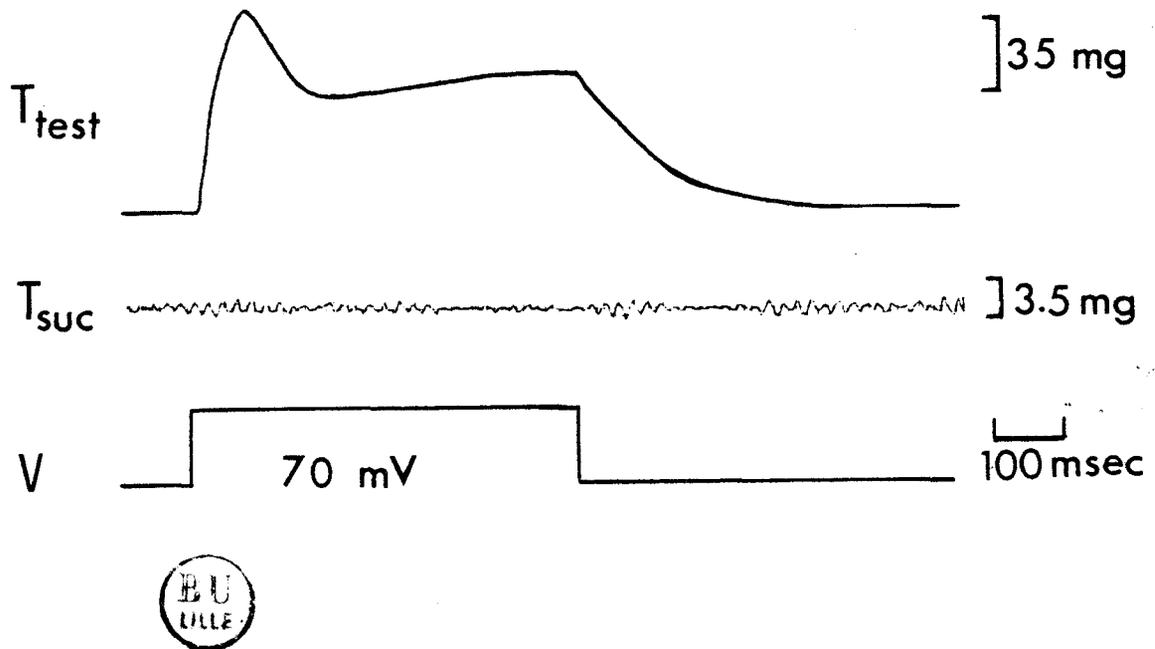
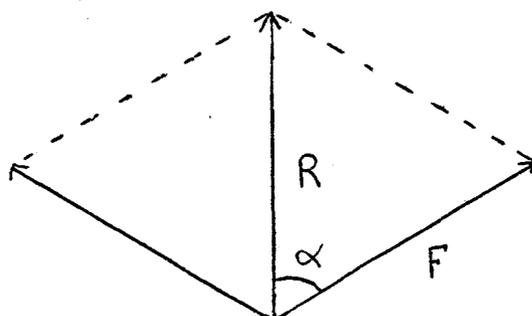


Figure 17 : Enregistrement de la contraction (T) induite par une dépolarisation imposée (V) d'amplitude 70 mV et de durée 550 msec. La tension a été enregistrée simultanément dans le compartiment test et dans l'un des compartiments de saccharose. Notez l'augmentation de la sensibilité de l'enregistrement effectué dans le compartiment de saccharose.

Fibre n° 203

(D'après GOBLET et MOUNIER, 1982)



Lors de toutes les expériences effectuées, nous avons imposé à la membrane, à intervalles réguliers, une dépolarisation donnée (en général 55 mV-15 msec) afin de s'assurer de la constance des conditions expérimentales. S'il apparaissait des variations notables d'amplitude de la tension au cours du déroulement de l'expérience, celle - ci était jugée inexploitable.

Finalement, la possibilité que les courants entrants se développant dans la partie centrale de la fibre conduisent au développement d'une contraction des portions de fibre situées dans les compartiments voisins, (compartiments saccharose), a été exclue par l'expérience suivante (Fig. 17). La tension induite par une dépolarisation d'amplitude 50 mV et de durée 550 msec a été enregistrée simultanément dans le compartiment test et dans l'un des compartiment saccharose. Les résultats montrent le développement dans le compartiment test d'une contraction typique que nous décrirons dans le chapitre "Résultats". Dans le compartiment saccharose aucune contraction n'est enregistrée. Un résultat identique a été obtenu en enregistrant dans l'autre compartiment contenant du saccharose.

B - Techniques utilisées sur les fibres pelées

1. Mesure de la tension mécanique

La tension développée par la fibre musculaire est enregistrée à l'aide d'un capteur de force BG 10 J211 (Kulite Semi-conductor Products, Inc., Ridgefield, NJ, USA) composé d'un pont de Wheastone complet, alimenté en tension stabilisée par un appareil construit dans le service d'électronique du laboratoire. En outre cet appareil recueille et amplifie la réponse du capteur. Les caractéristiques du signal final qui s'inscrit sur l'enregistreur papier Allcoscript EN 48 (Gould, Longjumeau, France) sont de 1200 mg/V. La relation est linéaire dans la gamme qui nous intéresse (jusqu'à environ 1000 mg).

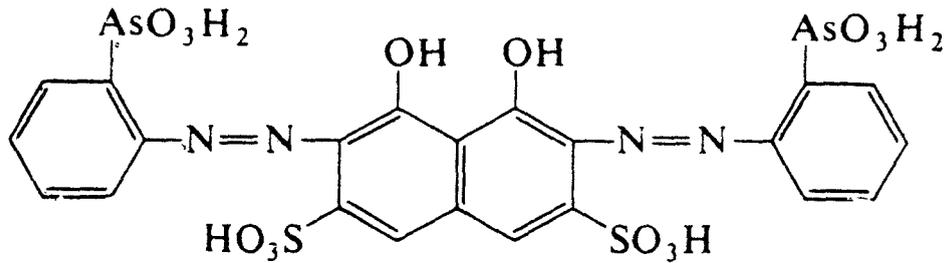
2. Mesure de la concentration calcique

Nous verrons (chapitre "Résultats") que l'action des ions strontium et du chlorure de tétraéthylammonium sur l'appareil contractile rend problématique l'étude de la capture du calcium et du largage calcique par le RS par l'intermédiaire d'une mesure de l'activité mécanique. Cela nous a conduit à utiliser une technique basée sur l'utilisation d'un indicateur métallochromique, l'arsenazo III.

a. Principe

L'arsenazo III est un indicateur métallochromique de poids moléculaire 776. Sa formule chimique développée est la suivante :

Arsenazo III



O-(1,8-Dihydroxy-3,6-disulfo-
naphthalene-2,7 bisazo)-bis-
benzenearsonic acid



En présence de calcium la molécule d'arsenazo libre (mauve) forme le complexe Ca-arsenazo (bleu-violet). Le spectre d'absorption de ces deux composés diffère (Fig. 18) et l'absorption lumineuse d'une solution d'arsenazo est d'autant plus importante que la concentration calcique est élevée (Fig. 19). Cette technique colorimétrique permet donc d'évaluer les variations de concentration calcique intracellulaire, tout en conservant intacte la structure de la fibre musculaire (continuité RS-protéines) et ceci d'autant plus que le temps de formation du complexe Ca-arsenazo est court (de l'ordre de la msec) par rapport au phénomène étudié.

L'arsenazo sera utilisé dans la présente étude pour détecter et quantifier les variations de concentration en calcium dans le milieu sarco-plasmique à la suite d'un largage calcique provoqué par la caféine.

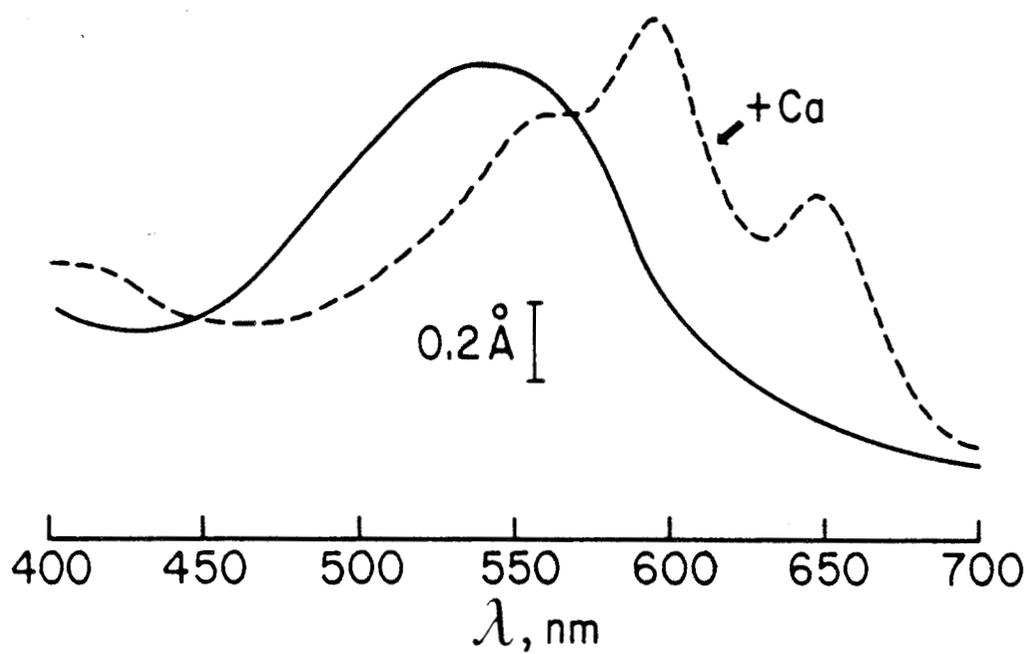


Figure 18 : Spectre d'absorption lumineuse de l'arsenazo III (25 μM) en absence et en présence de calcium.

(D'après SCARPA et coll., 1978).

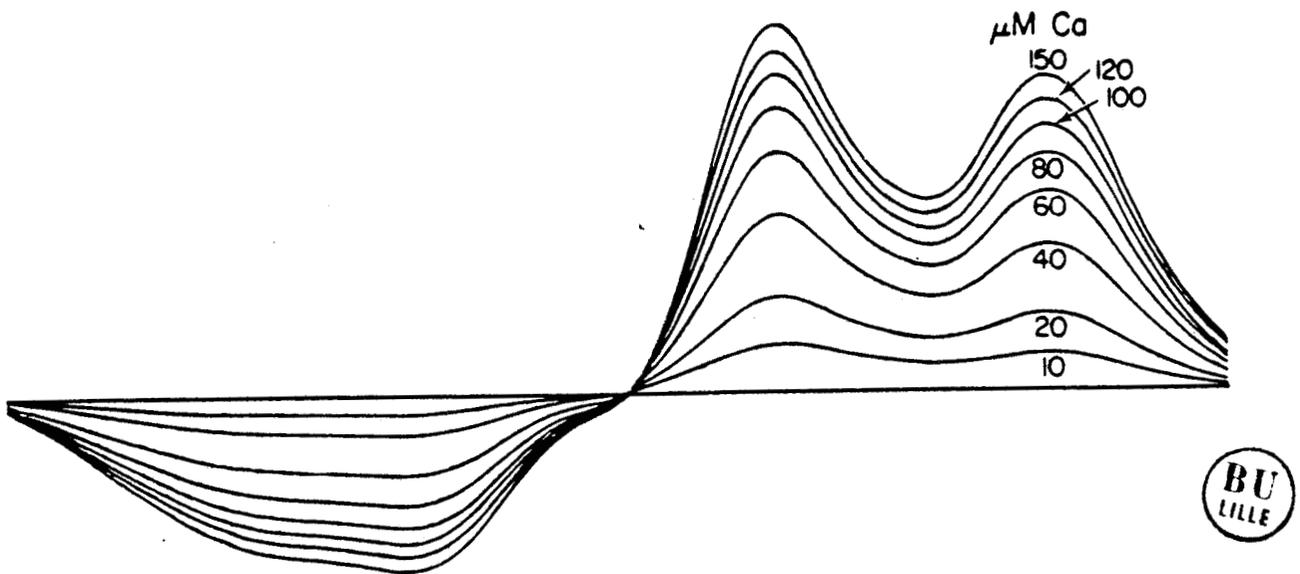


Figure 19 : Spectre d'absorption lumineuse de l'arsenazo III (100 μM) pour des concentrations variées de calcium.

La ligne horizontale représente de gauche à droite des longueurs d'onde (λ) de plus en plus importantes. L'échelle n'est pas précisée par les auteurs.

(D'après SCARPA et coll., 1978, modifié).

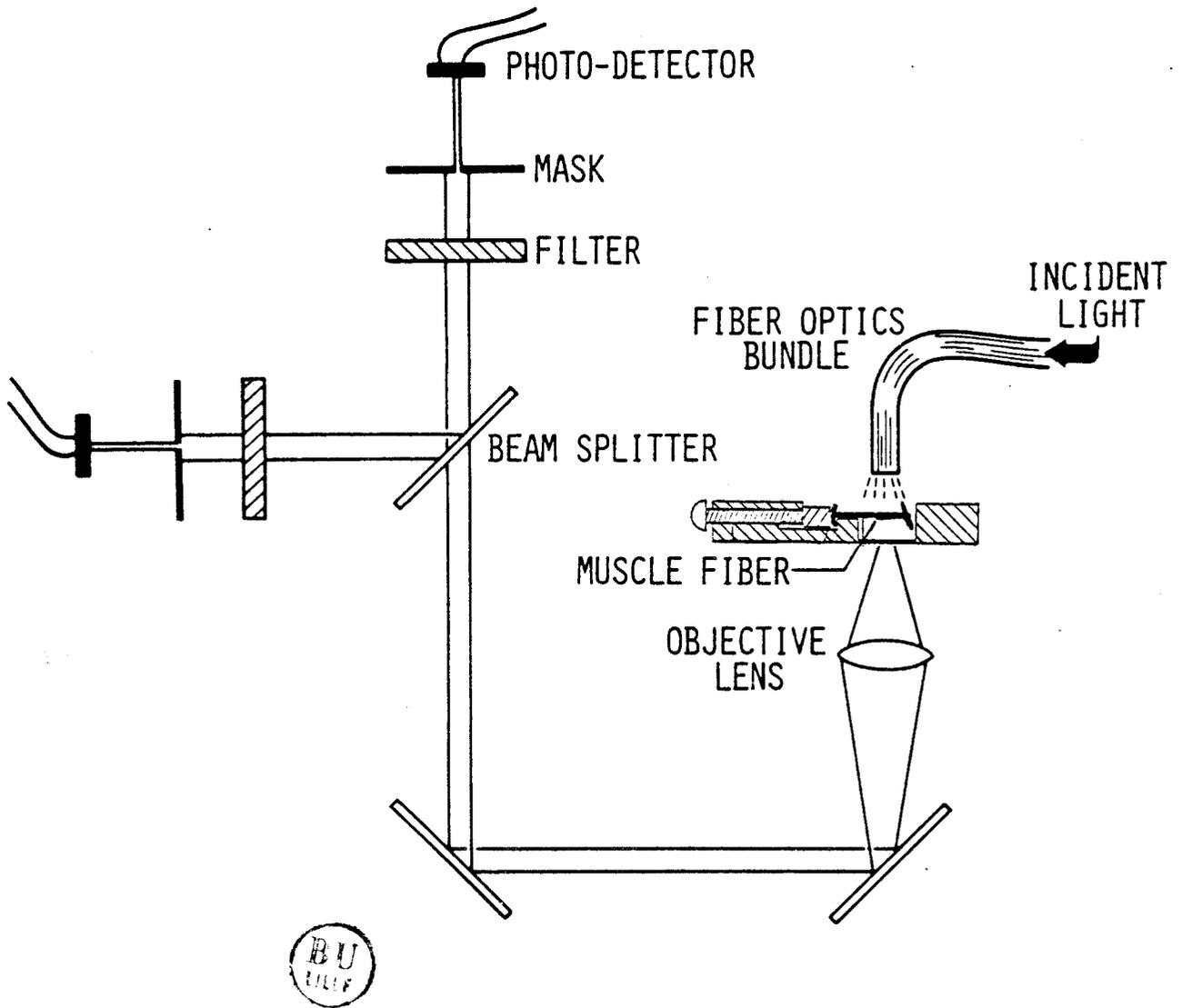


Figure 20 : Schéma du poste d'expérimentation Arsenazo III.

(D'après REUBEN, 1982, modifié).

b - appareillage (Fig. 20)

Le matériel de mesure des variations d'absorption lumineuse de l'arsenazo III au niveau du sarcoplasme des fibres musculaires de Crabe a été conçu et fabriqué par G. M. KATZ (KATZ et coll., 1981). Une source lumineuse à halogène alimentée par un générateur de tension stabilisée (92.2 V continu) éclaire verticalement la fibre musculaire située dans la cuve expérimentale, par l'intermédiaire d'une fibre optique. Les solutions qui baignent la fibre musculaire pelée contiennent de l'arsenazo III (98.75 μM) et sont changées rapidement grâce à un dispositif d'aspiration.

Les variations d'absorption sont enregistrées au niveau de la fibre, qui est centrée dans l'objectif du microscope à inversion. La lumière, après passage à travers la fibre et le bain contenant de l'arsenazo III est reçue par l'objectif du microscope et déviée vers les deux oculaires, où sont incorporés les filtres (Corion Corp., Holiston, Massachusetts, USA) et les photodétecteurs (250 B de E.P.G., Salem, Massachusetts, USA). Ce signal lumineux est ensuite filtré de façon telle que seules les variations d'absorption lumineuse présentes d'une part à 570 nm et d'autre part à 660 nm puissent être amplifiées. Ces signaux émis par les deux oculaires modifiés (660 nm, 570 nm) sont recueillis et traités par des amplificateurs opérationnels (AD 515J, Analog devices, Inc., Norwood, Mass., USA). L'électronique de l'amplificateur permet également d'effectuer la soustraction suivante :

$$\Delta A_{660} - \Delta A_{570}$$

où ΔA_{660} est la variation d'absorption lumineuse à 660 nm, proportionnelle à la concentration d'arsenazo III complexée au calcium (Ca-arsenazo) et

ΔA_{570} la variation d'absorption lumineuse à 570 nm (point isobestique) c'est à dire à la longueur d'onde pour laquelle l'absorption lumineuse de l'arsenazo libre est égale à celle du complexe Ca-arsenazo (pour une concentration donnée d'Arsenazo III). Le résultat de cette soustraction est appelé signal différentiel. Elle permet d'annuler les variations d'absorption lumineuse, dues aux modifications de diamètre et au mouvement de la fibre ainsi qu'aux variations possibles de l'intensité de la source lumineuse. Pour des facilités de lecture ce signal différentiel est amplifié 10 fois. L'ensemble de ces trois signaux amplifiés ΔA_{660} , ΔA_{520} et $(\Delta A_{660} - \Delta A_{570}) \times 10$ sont enregistrés sur l'enregistreur papier Allcoscript EN 48.

III - SOLUTIONS

L'exposé des résultats fait référence à des expériences effectuées soit sur fibre intacte soit sur fibre pelée. La nature des solutions utilisées sur ces deux préparations est différente. C'est pourquoi la présentation des solutions utilisées sera divisée en deux paragraphes. Dans le premier paragraphe on décrira les solutions utilisées sur fibre intacte, dans le second celles utilisées sur fibre pelée.

A - Solutions utilisées dans les expériences avec fibre intacte

Ces solutions ont été confectionnées avec de l'eau de ville déminéralisée après passage sur deux séries de résines échangeuses d'ions. Leur pH est égal au pH de la solution d'eau de mer artificielle c'est-à-dire 7.8. Lorsque le pH diffère de 7.8 il est ramené à cette valeur par un tampon tris-maléate.

1. Eau de mer artificielle : solution physiologique externe
de référence : ASW

NaCl	: 510 mM
KCl	: 12,9 mM
CaCl ₂	: 11.8 mM
MgCl ₂	: 23.6 mM
NaHCO ₃	: 2.6 mM
pH	: 7.8

2. Autres solutions physiologiques externes

Les solutions enrichies en calcium, résultent de l'addition de CaCl₂ à la solution ASW. La pression osmotique est maintenue constante par diminution équimoléculaire de NaCl.

La solution appauvrie en calcium, résulte du retrait de CaCl₂ à la solution ASW. La pression osmotique est maintenue constante par adjonction équimoléculaire de NaCl.

La solution pauvre en sodium est une solution d'eau de mer artificielle pour laquelle la concentration en NaCl est égale à 1/3 de la concentration normale. Les 2/3 manquants sont remplacés par LiCl.

3. Solutions avec inhibiteurs de perméabilité

Dans plusieurs expériences nous avons ajouté au liquide physiologique des substances inhibant totalement ou partiellement certaines perméabilités membranaires.

Ce sont :

- le chlorure de tétraéthylammonium (50 mM)
- le chlorure de manganèse. (5 mM)
- la 4-aminopyridine (1 mM)

Le chlorure de manganèse et la 4-aminopyridine étant utilisés à faible concentration aucun réajustement osmotique n'a été effectué. Par contre dans le cas du TEA une quantité équivalente de NaCl est retirée.

4. Solutions avec drogues pharmacologiques

La procaïne est ajoutée à la solution ASW à une concentration de 2 mM.

La caféine est ajoutée sous forme de poudre à une concentration de 6 mM soit à la solution ASW soit à la solution ASW dépourvue de calcium.

B. Solutions utilisées dans les expériences avec fibre pelée

Tous les produits chimiques entrant dans la composition de ces solutions sont d'une très grande pureté (Reagent grade). Ils proviennent de Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA) excepté la caféine (Merck, Darmstadt, RFA).

Toutes les solutions de base sont réalisées avec une eau très pure (en particulier dépourvue de calcium), de résistivité supérieure à 18 M Ω , obtenue par passage d'une eau de ville prétraitée (colonne échangeuse d'ions) sur un système de purification milli-Q (Millipore Molsheim, France). Elles sont ajustées au pH 7.00 ± 0.02 à l'aide de la potasse, KOH (1N, 0.1N) ou de l'acide propionique (1N, 0.1N).

Toutes les solutions sont gardées au réfrigérateur (+ 5°C) exceptées certaines qui sont conservées au congélateur à -20°C (précisé dans le texte).

1. Solutions mères

a - Propionate de potassium (K prop)

Cette solution est préparée à une concentration 2M par réaction mole à mole de potasse (KOH) et d'acide propionique. Cette réaction est exothermique.

b - MOPS ou 3 - N-Morpholino propane sulfonic acid

Ce composé préparé à une concentration de 500 mM joue le rôle de tampon pH.

c - Acétate de Magnésium : $Mg (C_2H_3O_2)_2$

La solution mère est préparée à une concentration de 500 mM. Le magnésium est ajouté aux solutions utilisées durant les expériences car il est indispensable au fonctionnement de la myosine - ATPase des protéines contractiles et de l'ATPase calcique du RS.

d - EGTA ou Ethylene Glycol-bis (β -aminoethyleter) N,N'-Tetraacetic Acid

L'EGTA est un chélateur du calcium. Il entre dans la composition de la solution relaxante et des solutions de concentrations variées en calcium et strontium (pCa et pSr) (voir plus loin). Outre le fait qu'il agit comme un tampon calcique, son intérêt est aussi qu'il ne pénètre pas dans la lumière du réticulum sarcoplasmique (WEBER, 1966). Trois produits contenant

de l'EGTA sont confectionnés :

K₂ EGTA (500 mM)

La solution est amenée au pH 7.00. La solubilité de ce composé est fonction du pH : faible pour des pH faibles et totale pour un pH voisin de 7.00.

Ca-EGTA (200 mM)

Solution préparée à partir de CaCO₃ et H₄-EGTA, neutralisée par KOH. Combiné à K₂-EGTA, ce composé permet de fixer et de tamponner les concentrations en Ca⁺⁺ libre des solutions dites pCa (pCa = - log [Ca]).

Sr EGTA (200 mM)

Solution préparée à partir de SrCO₃ et H₄-EGTA, neutralisée par KOH. Combiné à K₂EGTA, ce composé permet de fixer et de tamponner les concentrations en Sr⁺⁺ libre des solutions dites pSr (pSr = - log [Sr]).

e - Adénosine - Tri - Phosphate (ATP)

La solution mère d'ATP est confectionnée à une concentration de 200 mM par solubilisation dans l'eau distillée. Le pH est amené à pH 7.00 ± 0.02 à l'aide de NaOH. Cette solution est stockée à - 20°C et décongelée au début d'une journée d'expérience. Durant l'expérimentation cette solution est stockée dans de la glace pilée.

f - Caféine

La solution mère est préparée à une concentration de 20 mM par solubilisation de la caféine en poudre dans la solution de lavage ou dans la solution de concentration calcique faible.

g - Brij 58

La solution mère de brij 58 est obtenue par solubilisation du composé solide dans la solution relaxante à une concentration de 10 % (poids/poids). Cette solution est stockée à - 20°C.

h - Chlorure de calcium

La solution mère est confectionnée à une concentration de 2.0 mM par solubilisation du produit en poudre dans la solution de lavage.

i - Adénosine - Di - Phosphate (ADP)

Une solution mère de 100 mM est effectuée par solubilisation de l'ADP en poudre dans la solution de lavage. Le pH est contrôlé. La solution est congelée à - 20°C et décongelée juste avant l'utilisation.

j - Chlorure de tétraéthylammonium

La solution mère est confectionnée à une concentration de 1 M par solubilisation du TEA en poudre dans la solution de concentration calcique faible (Ca_f) ou dans la solution Ca_f contenant 0.5 mM de caféine. Le pH est contrôlé. Cette solution mère est congelée à - 20°C et décongelée pour la préparation des solutions avant l'expérimentation.

2. Solutions utilisées lors de l'expérimentation

Pour plus de clarté et afin de faciliter la consultation de ce paragraphe lors de la lecture des résultats, les solutions seront présentées en plusieurs subdivisions. Tout d'abord seront présentées les solutions utilisées couramment et citées tout le long de l'exposé des résultats. Ensuite, les autres solutions seront décrites selon le plan des résultats. Les solutions arsenazo seront présentées dans un paragraphe spécifique.

Au début d'une journée d'expériences, les solutions sont ramenées à la température ambiante. Les solutions mère d'ATP, d'ADP, de brij et de TEA sont décongelées et diluées dans les solutions adéquates. L'ATP est ajouté à toutes les solutions utilisées durant l'expérimentation à une concentration de 2.5 mM.

a - Solutions couramment utilisées

Solution relaxante, R : 170 mM propionate de potassium, 2.5 mM acétate de magnésium, 5 mM K_2 EGTA, 10 mM MOPS. Le calcul des valeurs de pMg ($-\log [Mg^{2+}]$), pATP ($-\log [ATP]$) et pMg ATP ($-\log [MgATP]$) à l'aide du programme 3 de FABIATO et FABIATO (1979), a été effectué en prenant les constantes d'association suivantes : K_{MgEGTA} , $40 M^{-1}$ et K_{MgATP} , $1.0 \times 10^4 M^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977). Les résultats sont pMg, 3.4 ; pATP, 3.3 et pMgATP, 2.7.

Solution de lavage, W : 185 mM de propionate de potassium, 2.5 mM d'acétate de magnésium, 10 mM MOPS. Les valeurs calculées de pMg, pATP et pMgATP sont respectivement égales à 3.3, 3.3 et 2.7.

Solution de charge, pCa 6.6 : 172 mM de propionate de potassium, 2.44 mM d'acétate de magnésium, 10 mM MOPS, 5 mM total d'EGTA dont 3.4 mM de K₂ EGTA et 1.6 mM de Ca EGTA. La valeur de pCa a été déterminée en utilisant une constante d'association apparente du calcium pour l'EGTA égale à $1.919 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977).

Solution brij 2 % : Une certaine quantité de la solution mère (10 %) est diluée dans la solution relaxante (R) afin que la concentration finale soit égale à 2 %. La présence d'EGTA dans la solution brij est indispensable afin d'éviter le développement d'une contraction induite par le détergent. En effet, le détergent en détruisant la membrane du RS libère du calcium présent dans le RS, très certainement lié à la calsequestrine, et induit une contraction.

b. Solutions utilisées lors de l'établissement des caractéristiques générales des fibres musculaires.

Outre les solutions R, W et pCa 6.6 présentées dans le paragraphe a intitulé "solutions couramment utilisées", les solutions utilisées dans les expériences présentées dans ce chapitre sont les suivantes :

Solutions caféiniques : on obtient les solutions caféiniques de concentrations 2.5, 5 et 10 mM par dilution en série dans la solution de lavage, de la solution mère de caféine (caféine 20 mM) confectionnée à l'aide de la solution de lavage.

Solutions pCa : Les solutions pCa sont confectionnées à l'aide de tous les composants présents dans la solution de lavage auxquels sont ajoutés CaEGTA et K_2EGTA . La concentration totale d'EGTA est constante et égale à 5 mM quelle que soit la pCa. La valeur de la pCa est déterminée par les concentrations relatives de CaEGTA et K_2EGTA et en utilisant une constante d'association du calcium pour l'EGTA égale à $1.919 \cdot 10^6 M^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977). Afin de maintenir la force ionique de l'ensemble de nos solutions constantes la concentration en propionate de potassium est légèrement diminuée par rapport à celle présente dans la solution de lavage et la concentration en magnésium acétate est diminuée de 4 %. Il faut noter ici que les valeurs de la constante d'association du Ca pour l'EGTA données dans la littérature sont très variées : $1.919 \cdot 10^6 M^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977), $1.9498 \cdot 10^6 M^{-1}$ (CORNELIUS, 1982), $2.512 \cdot 10^6 M^{-1}$ (ALLEN et coll., 1977), $3.969 \cdot 10^6 M^{-1}$ (FABIATO et FABIATO, 1979), $4.8 \cdot 10^6 M^{-1}$ (PORTZEHL et coll., 1964), $4.9 \cdot 10^6 M^{-1}$ (SCHWARZENBACH et coll., 1957) et $6.0 \cdot 10^6 M^{-1}$ (ASHLEY et MOISESCU, 1977). Outre ces variations dans la valeur de la constante d'association du calcium par l'EGTA, il est bien établi que l'EGTA est hautement spécifique du calcium puisque la constante d'association apparente avec le magnésium est égale à $46 \pm 6 M^{-1}$ à $22 \pm 2^\circ C$ (ASHLEY et MOISESCU, 1977) ou $40 M^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977).

	KProp. (mM)	MOPS (mM)	Mg AC ₂ (mM)	K ₂ -EGTA (mM)	Ca-EGTA (mM)
pCa 7.0	172	10	2.46	4.20	0.80
6.8	172	10	2.46	3.85	1.15
6.6	172	10	2.44	3.40	1.60
6.4	172	10	2.44	2.85	2.15
6.2	172	10	2.44	2.28	2.72
6.0	172	10	2.42	1.73	3.27
5.8	172	10	2.42	1.25	3.75
5.6	172	10	2.40	0.86	4.14
5.4	172	10	2.40	0.57	4.43
5.2	172	10	2.40	0.36	4.64
5.0	172	10	2.40	0.22	4.78
4.8	172	10	2.40	0.11	4.89



Les valeurs calculées de pMg, pATP et pMg ATP en prenant les constantes d'association suivantes : K_{CaEGTA} , $1.919 \times 10^6 M^{-1}$; K_{CaATP} , $5.0 \times 10^3 M^{-1}$, K_{MgEGTA} , $40 M^{-1}$ et K_{MgATP} , $1.0 \times 10^4 M^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977) sont respectivement égales à 3.4, 3.3 et 2.7 quelle que soit la valeur de la pCa.

Solution p₀ : CaCl₂ dissous dans la solution de lavage : 0.3 mM.

c. Solutions utilisées pour la mise en évidence d'un largage calcique induit par des cations divalents

- Rôle du calcium

Solution de concentration calcique faible, Ca_f : solution de même composition que la solution de lavage mais effectuée à l'aide d'une eau déminéralisée légèrement contaminée en calcium. La concentration calcique déterminée par l'utilisation d'une électrode spécifique au calcium (ORION) se situe entre $1.6 \cdot 10^{-7}$ M et $1.25 \cdot 10^{-7}$ M.

Solution de concentration calcique faible additionnée d'EGTA : des petites quantités de la solution mère K_2EGTA (500 mM) sont diluées dans la solution Ca_f de façon telle que les concentrations finales d'EGTA soient égales à 1, 5, 7.5 et 10 μM EGTA.

Solutions caféiniques : les solutions caféiniques de concentrations 0.2, 0.4, 0.5 et 2.5 mM sont obtenues par dilution sériée dans la solution Ca_f de la solution mère de caféine 20 mM confectionnée à l'aide de la solution de concentration calcique faible.

- Rôle du strontium

Solutions induisant un largage : W + 0.02 mM $SrCl_2$ et W + 0.1 mM $SrCl_2$

pSr 6.6 : 172 mM de propionate de potassium, 2.44 mM d'acétate de magnésium, 10 mM MOPS, 5 mM total d'EGTA dont 4.975 mM de K_2EGTA et 0.025 mM de Sr EGTA. La valeur de pSr a été déterminée en utilisant une constante

d'association apparente du strontium pour l'EGTA égale à $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (MOISESCU et THIELECZEK, 1978).

P_o^{Sr} solution : W + 0.3 mM Sr Cl₂



Solutions pSr : Les solutions pSr sont confectionnées à l'aide de tous les composants présents dans la solution de lavage auxquels sont ajoutés Sr EGTA et K₂EGTA. La concentration totale d'EGTA est constante et égale à 5 mM quelle que soit la pSr. La valeur de la pSr est déterminée par les concentrations relatives de Sr EGTA et K₂EGTA et en utilisant une constante d'association du strontium pour l'EGTA égale à $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (MOISESCU et THIELECZEK, 1978). Afin de maintenir constante la force ionique de l'ensemble de nos solutions la concentration en propionate de potassium est légèrement diminuée par rapport à celle présente dans la solution de lavage et la concentration en magnésium est également diminuée.

Les solutions utilisées dans ce chapitre et contenant de l'arsenazo III seront décrites dans un paragraphe spécial intitulé "solutions arsenazo".

- d. Solutions utilisées pour l'étude du rôle de l'ADP dans le mécanisme de libération calcique et contrôle d'un effet spécifique sur le RS.

Solutions ADP : la solution contenant 5 mM d'ADP est obtenue par dilution de la solution mère d'ADP (100 mM) dans la solution de lavage. Les solutions de concentration 0.312, 0.625, 1.25 et 2.5 mM sont obtenues par dilution sériée dans la solution de lavage, de la solution d'ADP 5 mM.

Solution ADP + Arginine phosphate. Cette solution est obtenue par ajout dans une solution d'ADP 2.5 mM d'une quantité d'arginine phosphate en poudre telle que la concentration finale soit 10 mM.

e. *Solutions utilisées pour l'étude des effets des inhibiteurs potassiques sur la perméabilité calcique du RS et les protéines contractiles*

Pour les solutions d'eau de mer artificielle (ASW) et d'ASW additionnée de TEA 50 mM, voir le paragraphe 2 du paragraphe "solutions". Pour la solution de concentration calcique faible et de concentration caféinique 0.5 mM voir le paragraphe 4 du paragraphe "solutions".

Solution de concentration calcique faible additionnée de TEA ($Ca_f + TEA_{10}$). Une certaine quantité de la solution mère de TEA (1M) a été diluée dans la solution Ca_f de façon telle que la concentration finale soit égale à 10 mM.

Solution $Ca_f + TEA_{10}$ additionnée d'EGTA : des petites quantités de solution mère de K_2EGTA (500 mM) ont été diluées dans la solution $Ca_f + TEA_{10}$ afin d'obtenir des concentrations finales d'EGTA égales à 5, 7.5 et 10 μM .

Solution caféinique 0.5 mM additionnée de TEA : la solution contenant 50 mM TEA a été confectionnée par dilution d'une quantité de la solution mère (TEA 1M) dans la solution $Ca_f +$ caféine 0.5 mM. Les solutions de concentration 5 et 10 mM sont obtenues par dilution sériée de la solution $Ca_f 0.5 + TEA 50$ mM dans la solution caféinique 0.5 mM.

f. Solutions arsenazo

Etablissement des courbes de calibration

Deux béchers d'une concentration donnée d'arsenazo (0.1 mM) ont été préparés par dilution d'une solution mère d'arsenazo (5 mM) dans une solution de caféine (20 mM) contenant 2.5 mM ATP. L'un des béchers ne contient pas de calcium et l'autre 0.1 mM Ca. Par dilution sériée, une série de solutions contenant des concentrations variées en calcium et 98.75 μ M d'arsenazo est obtenue. Les concentrations calciques sont les suivantes : 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 et 100 μ M Ca. Le même protocole a été utilisé pour une solution calcique contenant 50 mM ainsi que pour le strontium.

L'établissement des courbes de calibration (Fig. 21) montre qu'à une augmentation de concentration en calcium ou en strontium égale à 100 μ M correspond une augmentation d'absorption lumineuse enregistrée au niveau du signal différentiel amplifié par 10, égale à 975 mV. Lorsque du TEA (50 mM) est présent dans la solution Ca + Arsenazo une augmentation en calcium égale à 100 μ M correspond à un signal différentiel (x 10) égal à 625 mV.

Solutions expérimentales contenant de l'arsenazo

Les solutions R, W et caféine 20 mM contenant 0.1 mM d'arsenazo ont été effectuées par dilution de la solution mère d'arsenazo dans ces solutions contenant 2.5 mM d'ATP.

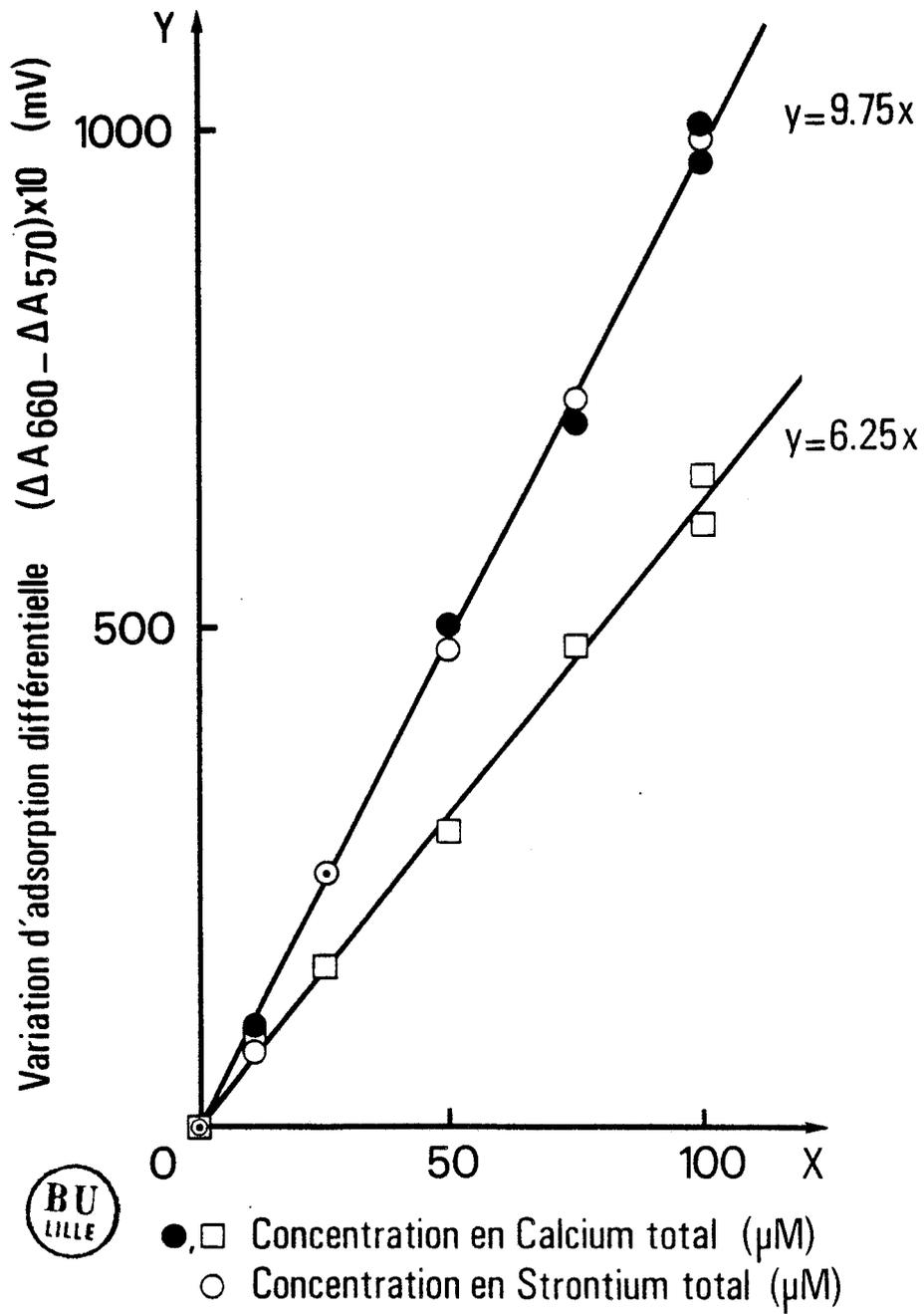


Figure 21: Courbes d'étalonnages effectuées dans la cuve expérimentale en absence de la fibre musculaire et en présence d'arsenazo III (0.1mM)

- pour une solution calcique avec caféine 20 mM (●)
- pour une solution calcique avec caféine 20 mM et TEACl (50 mM) (□)
- pour une solution contenant des ions Sr avec caféine 20 mM (○)

IV - LECTURE DES TRACES

A - Courants membranaires et contractions enregistrés sur fibres intactes.

La figure 22 illustre les courants membranaires (I) et la contraction (T) se développant lors de l'application d'une dépolarisation membranaire (V) d'amplitude égale à 58 mV et de durée 1000 msec. Les courants membranaires ont été enregistrés avec une correction automatique du courant de fuite. L'amplitude du courant entrant (I_i) a été mesuré par la méthode indiquée sur la figure 22.

Le décours de la contraction est complexe. Nous verrons dans le chapitre "Résultats" que cette tension peut être décomposée en 2 composantes T_1 et T_2 mesurées selon la méthode indiquée sur la figure 22.

B - Enregistrement des contractions sur fibres pelées.

Les contractions sont déclenchées par différentes solutions. L'application et le retrait de ces solutions provoquent des déflexions rapides. La lecture des tracés est indiqué sur le schéma-type ci-dessous.

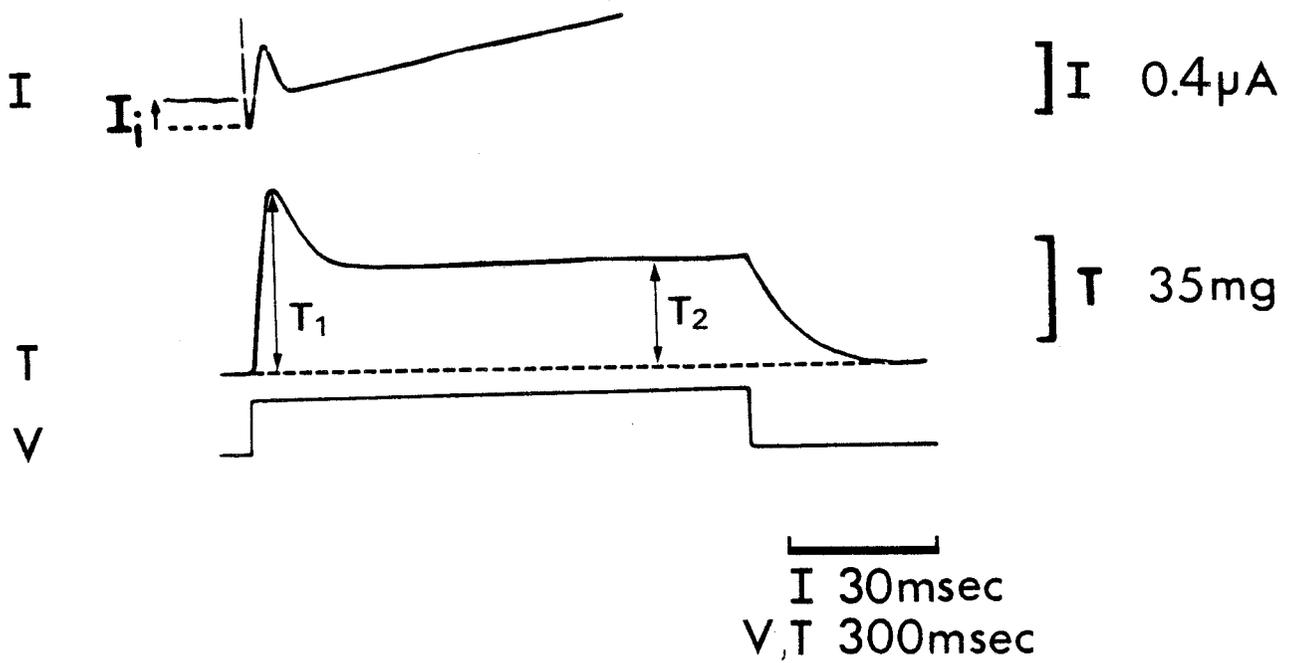


Figure 22 : Méthode de mesure du courant entrant membranaire (I_i) et de la contraction associée (T). Les flèches indiquent les amplitudes de I_i , T_1 et T_2 .

Fibre n° 210178

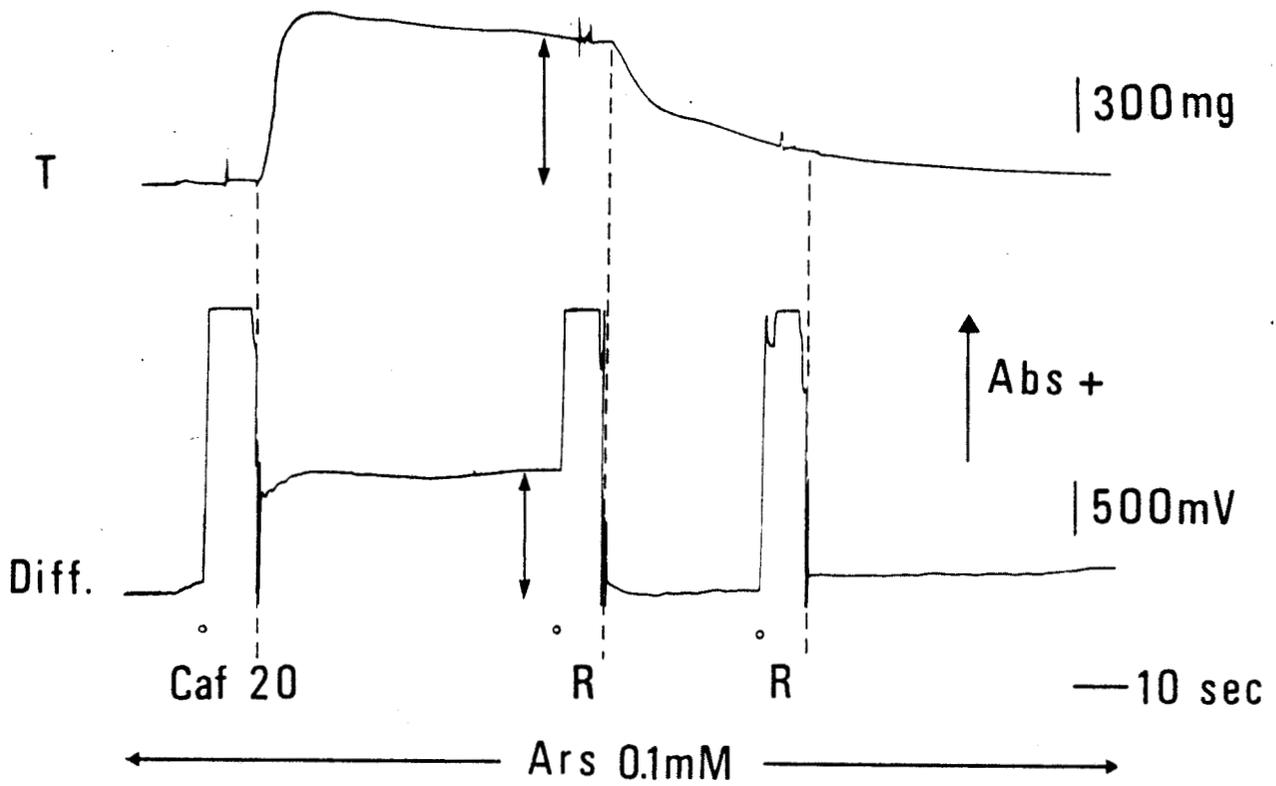
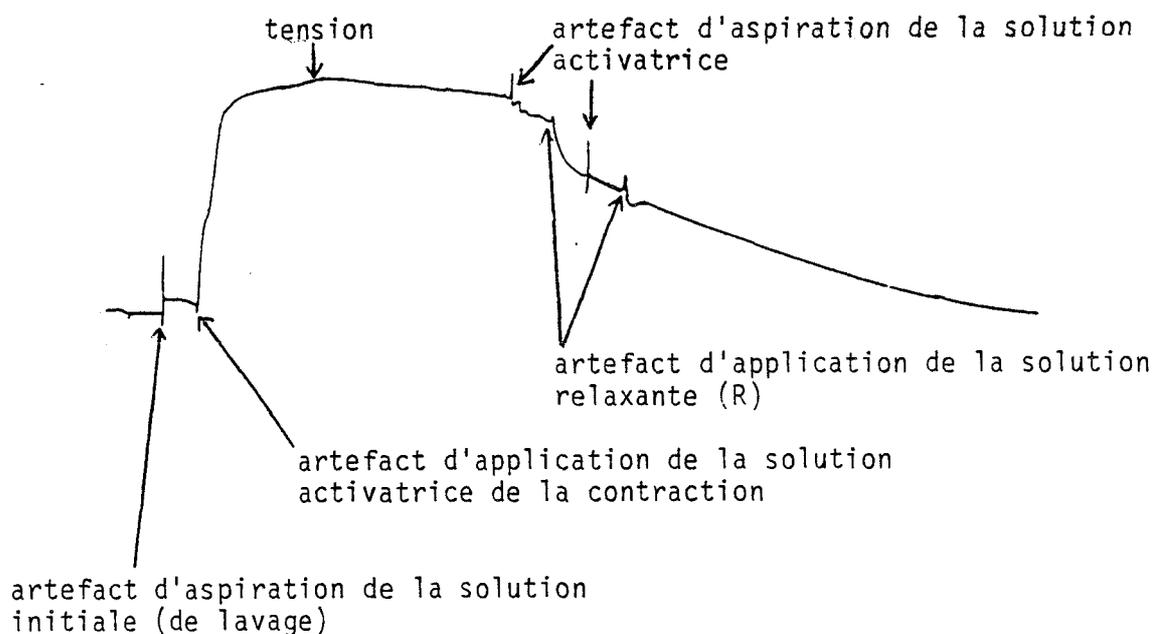


Figure 23 : Méthode de mesure de la contraction (T) et du signal arsenazo différentiel (Diff.). Les flèches indiquent leurs amplitudes respectives. Fibre n° 110785



C - Contraction et variation d'absorption lumineuse enregistrées sur les fibres musculaires pelées.

L'enregistrement simultané d'une contraction caféinique et d'une augmentation d'absorption lumineuse du signal différentiel de l'arsenazo III est illustré à la figure 23. L'instant où la solution est aspirée est repéré sur l'enregistrement de tension par le pic de l'artefact, et sur l'enregistrement d'absorption, par le symbole o. Tant que la préparation reste à l'air libre, l'artefact de tension garde un niveau légèrement supérieur à celui de la ligne de base ; l'artefact du signal différentiel se traduit par une déflexion importante. Les tiretés indiquent l'instant où est appliquée la solution fraîche, dont la nature est précisée et sera ultérieurement précisée sous l'enregistrement.

RECULP

RELATION ENTRE L'ACTIVITE ELECTRIQUE MEMBRANAIRE ET L'ACTIVITE MECANIQUE
DES FIBRES MUSCULAIRES DE CRABE.

I - ETUDE DES COMPOSANTES DE TENSION EN RELATION AVEC LE DEGRE D'EXCITA-
BILITE.

II - ETUDE DE LA CONTRACTION PHASIQUE.

III - ETUDE DE LA COMPOSANTE TONIQUE.

IV - APPROCHE DU COUPLAGE EXCITATION - CONTRACTION.

A - Influence de la procaïne.

B - Effet de la caféine.

CARACTERISTIQUES GENERALES OBTENUES SUR LES FIBRES MUSCULAIRES PELEES.

I - FONCTIONNEMENT DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE.

A - Perméabilité calcique du RS.

1 - Analyse des enregistrements.

2 - Courbe effet - dose.

B - Pompage calcique par le RS.

1 - Analyse des enregistrements.

2 - Courbe tension - variation du temps de charge.

C - Comparaison de deux contractions consécutives.

D - Destruction du RS par un détergent: le brij 58.

II - LES PROTEINES CONTRACTILES.

A - Contrôles expérimentaux.

1 - Comparaison de deux contractions.

2 - Contrôle de la non - intervention du réticulum sarcoplasmique.

B - Dépendance calcique de la contraction.

1 - Analyse des enregistrements.

2 - Courbe tension - pCa.

3 - Activité mécanique maximale.

MISE EN EVIDENCE D'UN LARGAGE CALCIQUE INDUIT PAR DES CATIONS DIVALENTS.

I - ROLE DU CALCIUM.

A - Largage induit par une solution d'activité calcique faible.

B - Caractère gradué du mécanisme de "Ca - induced Ca release"
et détermination de l'activité calcique minimale pouvant
induire une libération calcique à partir du RS.

C - Stimulation du mécanisme de "Ca - induced Ca release" par
la caféine.

II - ROLE DU STRONTIUM.

A - Largage calcique induit par les ions strontium.

B - Pompage et libération du strontium par le RS.

C - Fixation des ions Sr^{++} sur les protéines contractiles.

D - Conclusion.

ROLE DE L'ADP DANS LE MECANISME DE LIBERATION CALCIQUE ET MISE EN EVIDENCE D'UN EFFET SPECIFIQUE SUR LE RS

I - LIBERATION CALCIQUE INDUITE PAR L'ADP.

A - Relation effet - dose en ADP.

B - Relation entre le largage induit par l'ADP et le temps de charge du RS.

II - CONTROLES EXPERIMENTAUX.

A - Comparaison ds effets de l'ADP sur une fibre ayant un RS intact puis détruit.

B - Largage calcique induit par l'ADP en présence d'arginine phosphate.

III - CONCLUSION.

EFFETS DES INHIBITEURS POTASSIQUES SUR LES PROTEINES CONTRACTILES ET LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE.

I - LE TETRAETHYLAMMONIUM.

A - Courants ioniques membranaires et activité mécanique en présence de tétraéthylammonium.

B - Influence du tétraéthylammonium sur les protéines contractiles.

1 - Contrôles expérimentaux.

a - Contrôle de la non intervention du réticulum sarcoplasmique

b - Effets des ions chlorure sur les protéines contractiles.

2 - Relation tension - pCa en présence de chlorure de tétraéthylammonium.

a - Analyse des enregistrements.

b - Etablissement de la courbe tension - pCa.

c - Réversibilité.

3 - Conclusion.

C - Tétraéthylammonium et réticulum sarcoplasmique.

1 - Largage du calcium par le réticulum sarcoplasmique.

a - Action du chlorure de tétraéthylammonium.

b - Effets des ions chlorure sur le largage calcique par le RS.

c - Conclusion.

2 - Capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique.

a - Action du chlorure de tétraéthylammonium sur une charge calcique inframaximale.

b - Action du chlorure de tétraéthylammonium sur une charge calcique maximale.

c - Conclusion.

3 - Influence du TEA sur le mécanisme de "Ca - induced Ca release".

a - Modifications des caractéristiques du mécanisme de "Ca - induced Ca release" par le TEA.

b - Influence de la dose de TEA sur l'inhibition du mécanisme de "Ca - induced Ca release".

D - Conclusion.

II - LA 4 - AMINOPYRIDINE.

A - Courants ioniques membranaires et activité mécanique en présence de 4 - aminopyridine.

B - 4 - aminopyridine et protéines contractiles.

1 - Analyse des enregistrements.

2 - Relation tension - pCa.

C - Conclusion.

Le couplage excitation-contraction fait intervenir l'activité électrique de la membrane de surface, le largage du calcium par le réticulum sarcoplasmique, l'activation des protéines contractiles et le repompage du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Nous avons précédemment vu dans le chapitre historique la structure des différents acteurs de ce couplage ainsi que les hypothèses concernant leur fonctionnement.

Dans le cadre de l'exposé des résultats obtenus, je ferai auparavant un bref rappel de la relation existant entre l'activité électrique membranaire et l'activité mécanique des fibres musculaires du Crabe Carcinus maenas. J'aborderai ensuite les résultats obtenus sur les fibres mécaniquement pelées donnant à la fois des indications sur le mécanisme de largage du calcium par le réticulum sarcoplasmique ainsi que sur l'activité de pompage de l'ATPase calcique du RS et l'activité des protéines contractiles. En retour, certaines informations obtenues nous permettront d'améliorer notre compréhension du fonctionnement du canal calcique au niveau sarcolemmique et d'expliquer certains résultats obtenus dans le cadre de la préparation de ma thèse de 3ème cycle.

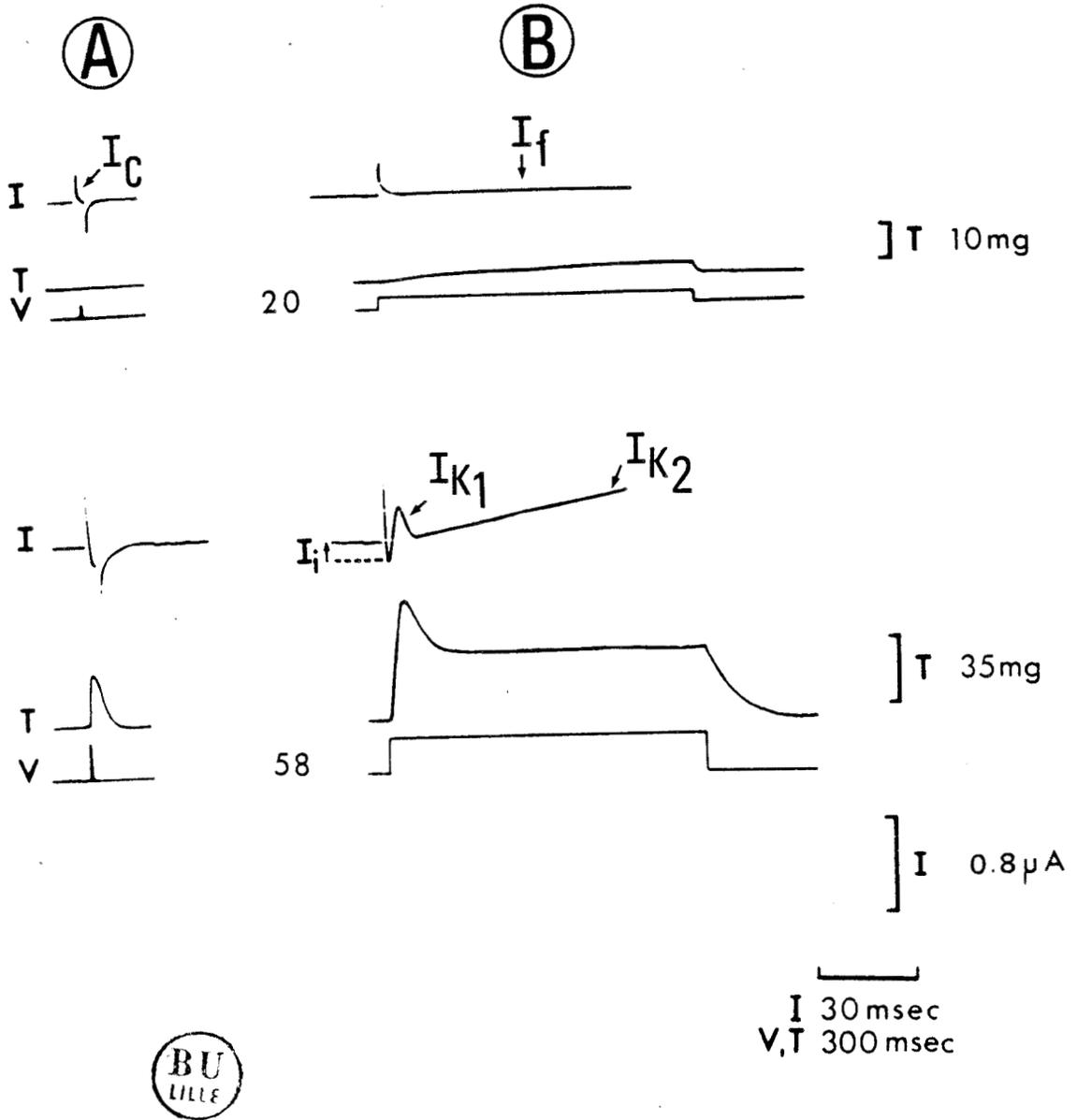


Figure 24 : Enregistrements des courants ioniques membranaires (I) et de l'activité mécanique (T) pour deux dépolarisations (V) d'amplitude différente (20 et 58 mV) en milieu ASW.

A : pour une courte durée de dépolarisation (5 msec)

B : pour une longue durée de dépolarisation (1000 msec).

Même fibre qu'à la figure 22.

RELATION ENTRE L'ACTIVITE ELECTRIQUE MEMBRANAIRE ET L'ACTIVITE MECANIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES DE CRABE. ^{*}

L'analyse simultanée des courants ioniques et de la tension développée par les fibres musculaires de crabe a permis de mettre en évidence deux composantes de tension.

I - ETUDE DES COMPOSANTES DE TENSION EN RELATION AVEC LE DEGRE D'EXCITABILITE

L'application de dépolarisations de différentes amplitudes montre clairement le rôle de chaque composante (Fig. 24).

Dépolarisation imposée de 20 mV : aucun courant ionique n'apparaît : la fibre n'est pas encore excitable et seuls sont enregistrés le courant capacitif (I_C) et le courant de fuite (I_f), que la dépolarisation dure 15 ou 1000 msec. Par contre une composante de tension, de cinétique très lente, apparaît lorsque le créneau de 20 mV est appliqué pendant 1000 msec. Cette composante de tension est maintenue tant que dure la dépolarisation et a été appelée : composante tonique. Elle sera étudiée plus longuement dans un paragraphe suivant.

^{*} Cette étude a fait l'objet de ma thèse de 3ème cycle et de la publication d'un article (GOBLET et MOUNIER, 1982).

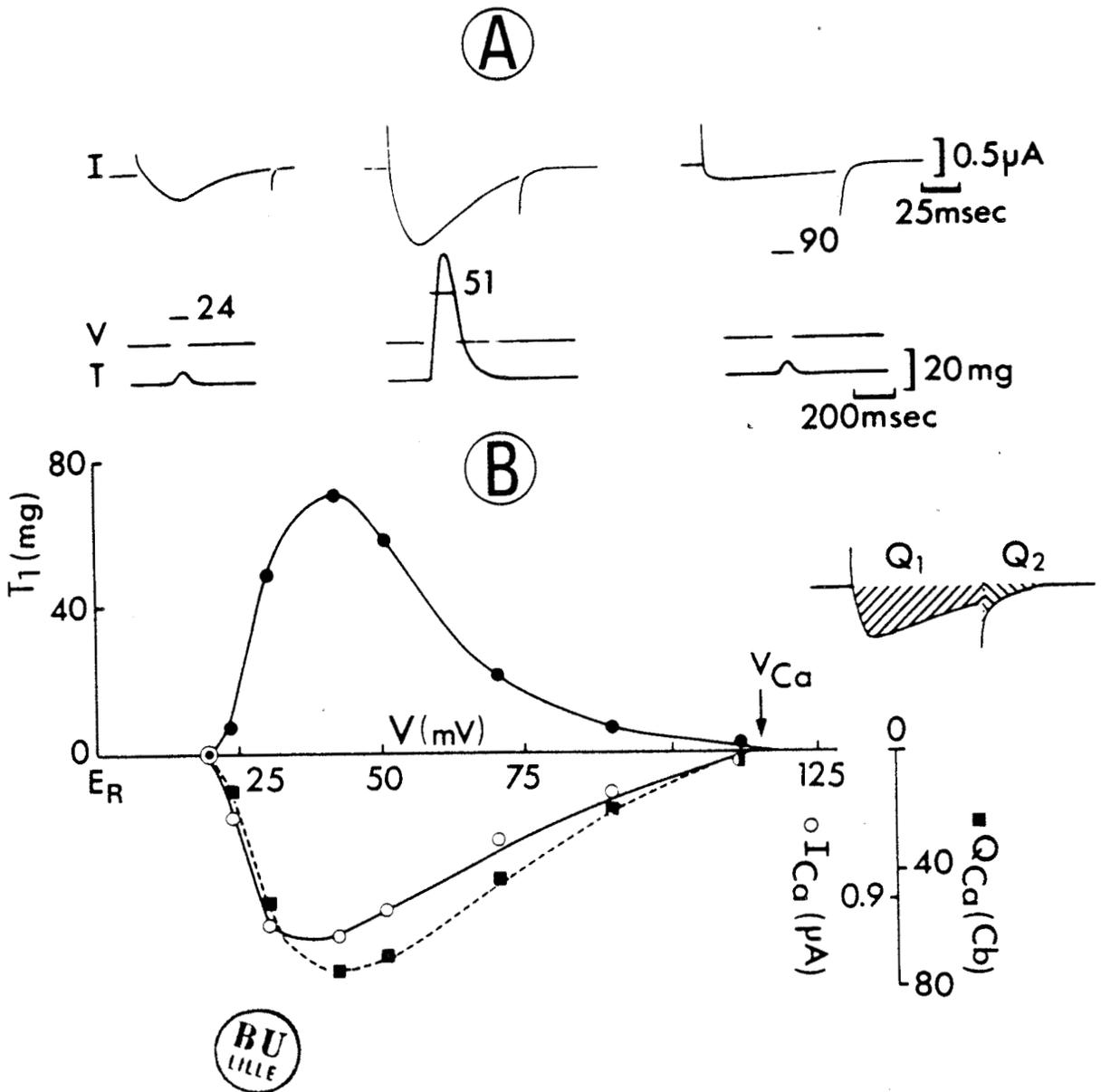


Figure 25 : Relation liant le courant calcique (I) et la contraction phasique (T_1) au potentiel membranaire (V). Noter la similitude des deux courbes (en B). Trois enregistrements de I et de T sont donnés (en A) pour des V imposés de 24 , 51 et 90 mV, d'une durée de 100 msec.

En B, la courbe en pointillés montre la relation entre la quantité de calcium $Q_{Ca} = Q_1 + Q_2$ (obtenue pour une dépolarisation imposée V) et la tension phasique (T_1). Noter que Q_{Ca} et T_1 évoluent parallèlement. L'expérience est réalisée en milieu TEA sans sodium.

Fibre n° 180179

Dépolarisation imposée de 58 mV : les courants ioniques sont activés : courant entrant (I_i) et courants sortants I_{K_1} et I_{K_2} . A cette activité électrique est associée une contraction phasique de décours simple quand la dépolarisation est de courte durée, et de décours plus complexe pour une dépolarisation imposée durable. La tension associée au courant entrant est de type phasique. Elle est suivie d'un plateau maintenu tant que dure la dépolarisation, rappelant la composante tonique.

II - ETUDE DE LA CONTRACTION PHASIQUE (Fig. 25)

La composante phasique T_1 est étudiée en milieu enrichi en chlorure de tétraéthylammonium (TEA 50 mM) de façon à supprimer les courants potassiques qui gênent la lecture de I_{Ca} et en milieu sans sodium pour éliminer la composante tonique de tension (voir paragraphe suivant).

La tension phasique dépend de l'activation et de l'amplitude du courant calcique. La relation liant l'amplitude de T_1 à la valeur du potentiel V imposé à la membrane est rigoureusement identique à celle existant entre le courant calcique et V .

De plus, nous avons pu montrer que T_1 et I_{Ca} sont influencés de façon identique par la concentration calcique extracellulaire puisqu'une augmentation de celle-ci accroît à la fois I_{Ca} et T_1 et qu'une réduction les diminue tous les deux. L'utilisation d'un inhibiteur du courant calcique, les ions manganèse, inhibe aussi T_1 . De même, un milieu sans calcium (CaO , EGTA) provoque la disparition totale de I_{Ca} et T_1 .

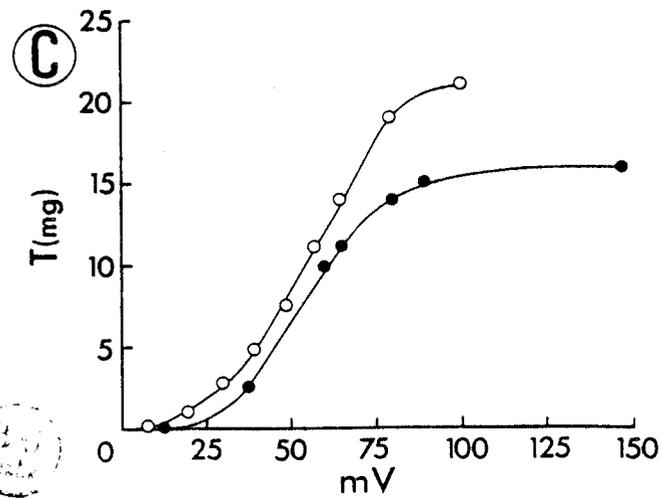
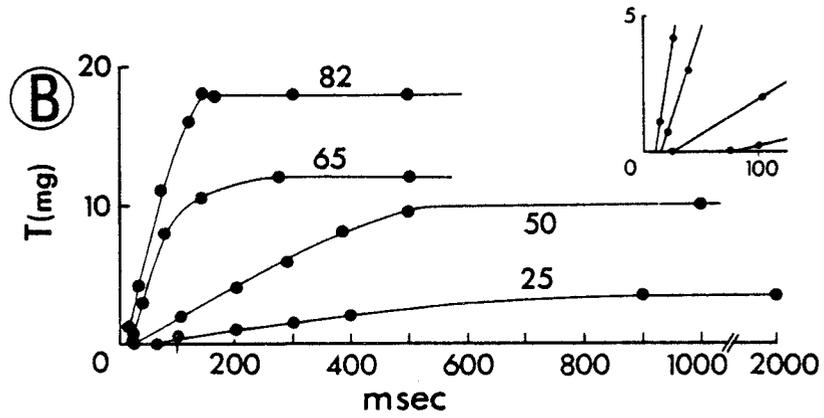
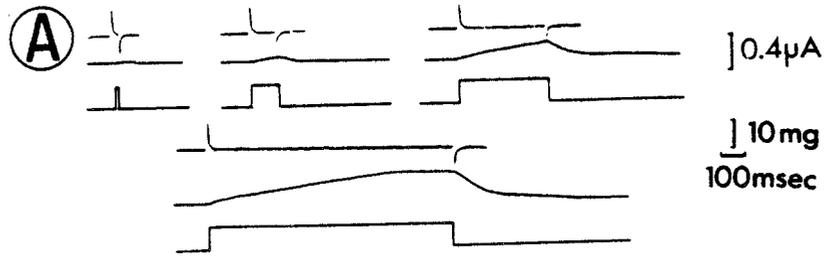


Figure 26 : La tension tonique (T_2) : évolution en fonction du potentiel et du temps.

A : Enregistrements des courants ioniques (I : tracés supérieurs) et de la tension (T : tracés au milieu) en fonction d'une dépolarisation imposée V de 50 mV (tracés inférieurs) de différentes durées. Noter l'apparition de la tension tonique alors qu'aucun courant ionique n'est activé.

(Fibre n° 060578).

B : Evolution des amplitudes de tension en fonction de la durée de la dépolarisation V. L'amplitude de V est donnée sur chaque courbe. L'encart correspond à une amplification de la partie initiale des différentes courbes. (Fibre n° 060578).

C : Relation entre les amplitudes maximales de la tension (obtenues à l'état stable) et la dépolarisation imposée. Les cercles correspondent à des mesures à la fin d'impulsions de 1000 msec sur une fibre excitable (composante phasique relachée et composante tonique maximale). (Fibre n° 070278). Les points sont obtenus sur une fibre passive. (Fibre n° 060578). Noter la similitude des deux courbes.

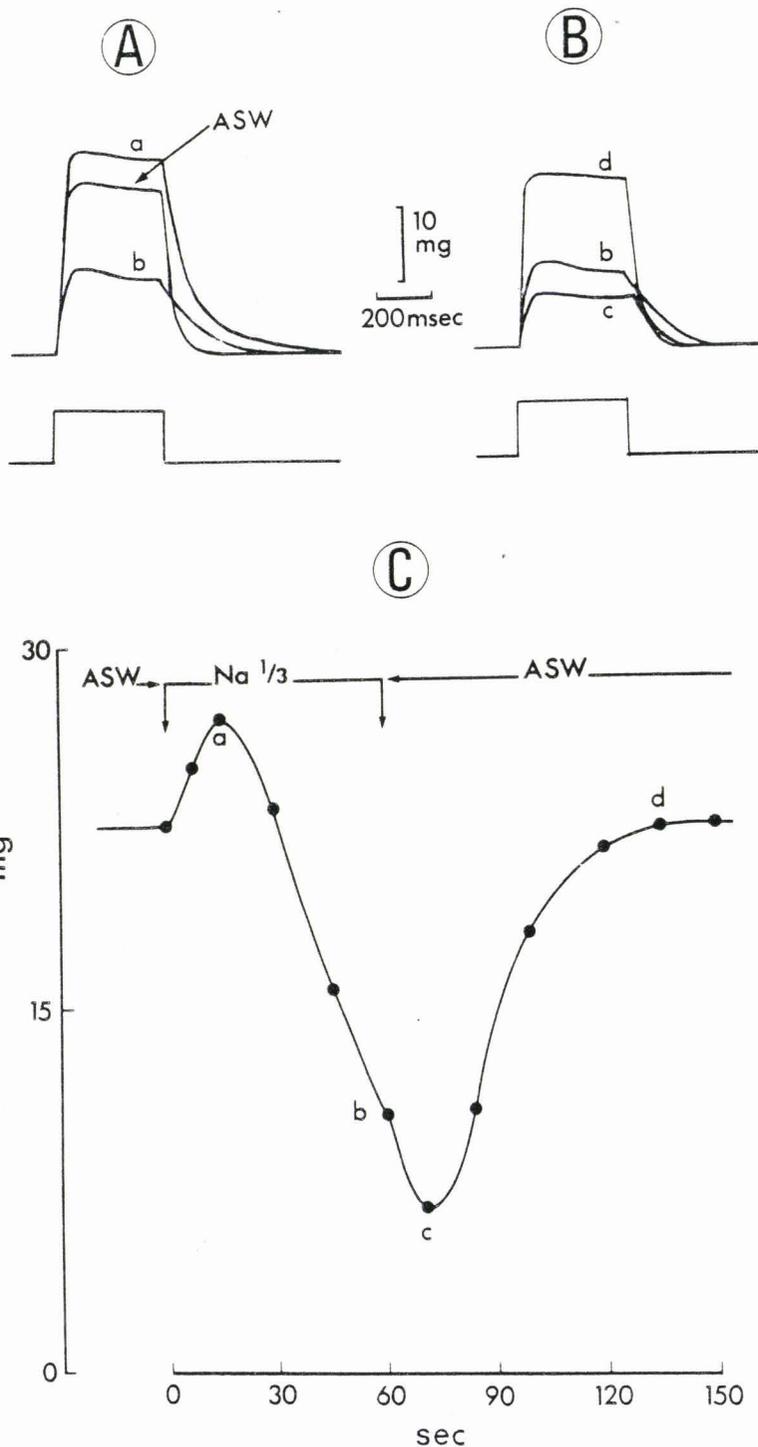


Figure 27 : Dépendance de la tension tonique vis à vis de la concentration sodique extracellulaire.

A : évolution de la tension tonique après substitution du milieu ASW par un milieu pauvre en sodium, après 15 sec d'action (tracé a) et 1 min d'action (tracé b).

B : évolution de la tension tonique lors du retour en solution ASW, après 15 sec (tracé c) et après la récupération totale (tracé d). Le tracé b est identique au tracé b de la partie A.

C : courbe traduisant l'évolution de l'amplitude de la contraction tonique (ordonnée) lors de l'application d'un milieu pauvre en sodium puis lors du retour en milieu ASW (abscisse).

Fibre n° 150581.

III - ETUDE DE LA COMPOSANTE TONIQUE (Fig. 26).

La deuxième composante de tension est une composante tonique T_2 . Celle-ci apparaît seule, lorsque des potentiels inférieurs au seuil de déclenchement de I_{Ca} sont imposés (voir ci-dessus pour $V = 20$ mV) ou lorsque le courant calcique est annulé ou inversé pour des potentiels imposés supérieurs au potentiel d'inversion de I_{Ca} . Elle apparaît également sur des préparations non excitables, c'est-à-dire ne présentant pas de potentiel d'action et aucun développement de courant ionique entrant (Fig. 26 A). On observe, pour une dépolarisation imposée de 50 mV, que plus la durée de l'impulsion est élevée, plus l'amplitude de la contraction est importante. Elle atteint un maximum pour une durée égale à 1000 msec. D'autre part, plus l'amplitude de la dépolarisation est élevée, plus la durée nécessaire pour atteindre l'amplitude maximale est courte (Fig. 26 B). De plus, la durée nécessaire au développement de la plus petite contraction est d'autant plus faible que l'amplitude de la dépolarisation est élevée (Fig. 26 B, encart). Enfin, l'établissement de la relation entre les amplitudes maximales de la tension et l'amplitude de la dépolarisation imposée (Fig. 26 C) montre que plus la dépolarisation est importante plus l'amplitude de la contraction est élevée. Elle atteint un maximum pour une dépolarisation imposée proche de 100 mV. En conclusion, la composante tonique de tension dépend de l'amplitude et de la durée de la dépolarisation imposée, la mise sous tension maximale étant d'autant plus rapide et plus ample que V est élevée.

La composante tonique dépend non seulement de la concentration calcique extracellulaire comme T_1 mais également de la concentration sodique (Fig. 27). On observe que dans un milieu pauvre en sodium (NaCl 1/3, LiCl 2/3) la contraction tonique enregistrée pour une impulsion supérieure au

potentiel d'inversion mesuré (100 mV) est tout d'abord accrue puis très nettement diminuée. Lors du retour aux conditions normales un phénomène inverse est observé : la contraction est tout d'abord diminuée puis augmentée jusqu'à une amplitude proche de l'amplitude de la contraction initiale. Cette expérience met en évidence la dépendance de la tension tonique vis à vis de la concentration sodique mais laisse aussi supposer que cette contraction est due à l'influx calcique de l'échange Na-Ca décrit sur de nombreuses préparations (voir HISTORIQUE).

Il nous est donc maintenant possible d'expliquer cette observation apparemment paradoxale de l'existence d'une contraction musculaire sur des préparations non excitables et, sur des préparations excitables, pour des dépolarisations imposées inférieures au seuil d'activation de I_{Ca} et supérieures au potentiel d'équilibre des ions Ca^{++} . Il s'agit donc d'une composante tonique de tension, lente, déclenchée par la dépolarisation membranaire, qu'un courant entrant calcique soit ou non activé. Ce type de réponse est particulièrement fréquent en hiver.

IV - APPROCHE DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

Les résultats présentés montrent une grande dépendance de la tension à la concentration calcique extracellulaire quel que soit le niveau du potentiel membranaire. On peut se demander cependant s'il n'existe pas de source intracellulaire du calcium activateur de la contraction comme l'ont montré CAPUTO et DIPOLLO (1978) sur les fibres musculaires de Balane.

Pour répondre à cette question, nous avons effectué des expériences en présence d'une part d'un inhibiteur du largage calcique et du mécanisme de "Ca-induced Ca release" plus particulièrement : la procaïne, et d'autre part d'un agent induisant un largage calcique de type "Ca-induced Ca release" : la caféine.

A - Influence de la procaïne

L'expérience est illustrée à la figure 28 par la relation tension-potentiel et courant entrant-potentiel en milieu ASW et procaïne 2 mM pour une durée de dépolarisation de 300 msec. Les dépendances de la tension et du courant calcique au potentiel de membrane en milieu ASW sont classiques. En milieu procaïne, quelle que soit l'amplitude de la dépolarisation imposée, la tension est nulle. Par contre, le courant calcique apparaît nettement augmenté. Notons cependant que l'augmentation apparente de I_{Ca} peut être une conséquence de l'inhibition de I_{K1} (voir encart de la Fig. 28 pour un niveau de dépolarisation égal à + 55 mV). En effet, il est généralement admis que la procaïne n'augmente pas la conductance calcique (HAGIWARA et coll., 1969, sur la fibre musculaire de Balane). Le résultat présenté ici montre donc que le courant calcique seul ne permet pas le déclenchement de la contraction. De même, l'influx calcique du Na-Ca échange ne semble plus être suffisant pour permettre le déclenchement de la tension tonique. Il faut donc envisager l'existence d'une source interne du calcium activateur de la contraction.

On peut donc conclure, à la lumière de ces résultats, que le couplage excitation contraction des fibres musculaires de Crabe n'est pas direct et qu'une source interne de calcium, vraisemblablement le réticulum sarcoplasmique, doit être mise en jeu.

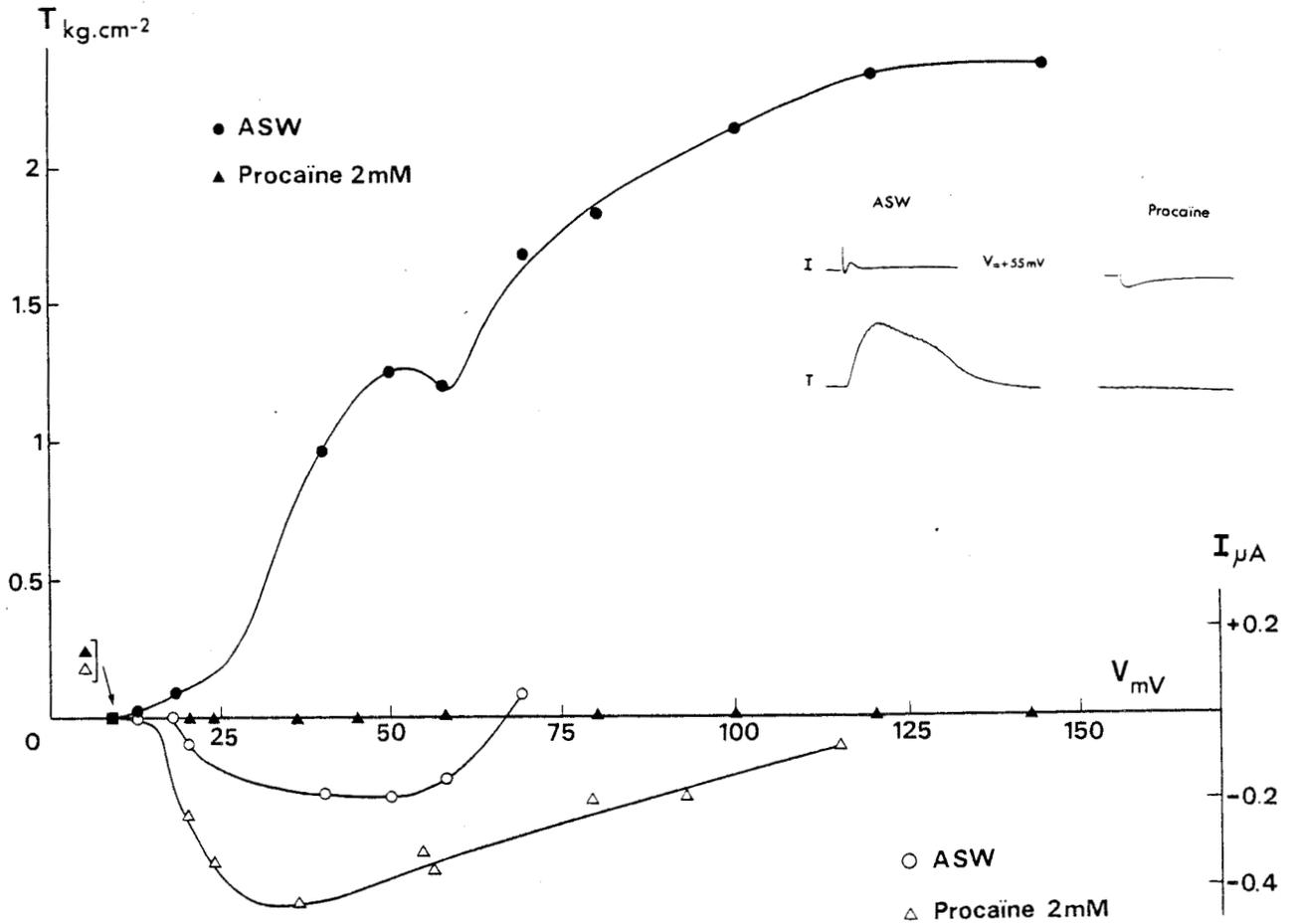


Figure 28 : Relation entre l'activité mécanique (T) et le potentiel membranaire (V) en milieu ASW (\bullet) et en milieu procaine 2 mM (\blacktriangle) et relation entre le courant entrant (I) et le potentiel membranaire (V) en milieu ASW (\circ) et en milieu procaine 2 mM (\triangle). Durée des dépolarisations égales à 300 msec.

Encart : courants membranaires (I) et activité mécanique (T) pour une dépolarisation imposée de 50 mV - 300 msec ; à gauche en ASW, à droite en milieu procaine 2 mM.

D'après GOBLET (1979).

B - Effet de la caféine

Un autre type d'expérience nous permet également de conclure au rôle du réticulum sarcoplasmique dans l'activité mécanique des fibres musculaires de Crabe. L'expérience a consisté à appliquer sur une fibre intacte une solution caféinique (Caf 6 mM) diluée dans de l'eau de mer artificielle puis une même solution diluée dans de l'eau de mer artificielle dépourvue de calcium (Caf 6 mM, Ca0).

L'application sur une fibre intacte d'une solution Caf 6 mM induit une contracture transitoire. La figure 29 illustre une contracture caféinique obtenue dans ces conditions. Ses caractéristiques sont les suivantes : amplitude, 179.17 mg ; temps de mise sous tension maximale, 220 sec ; temps de relaxation, 350 sec. Les résultats moyens obtenus sur 4 fibres donnent une amplitude de 168.42 +/- 7.36 mg (\bar{x} +/- SEM). Les temps de mise sous tension maximale et de relaxation sont variables. Ils varient de 220 sec à 870 sec et de 350 sec à 1460 sec respectivement. Lorsque la fibre est relâchée un bain d'une solution Caf 6 mM Ca 0 est appliqué. On observe le développement lent d'une contracture d'amplitude faible. Ses caractéristiques sont les suivantes : amplitude, 37.63 mg ; temps de mise sous tension maximale 293 sec.

Cette expérience permet de conclure que d'une part les réservoirs calciques intracellulaires sont responsables du développement de la contracture et que d'autre part le calcium extracellulaire joue lui aussi un rôle important. Cependant, afin d'être certain que la diminution importante de la contracture en milieu Caf 6 mM, Ca 0 est bien due à l'absence

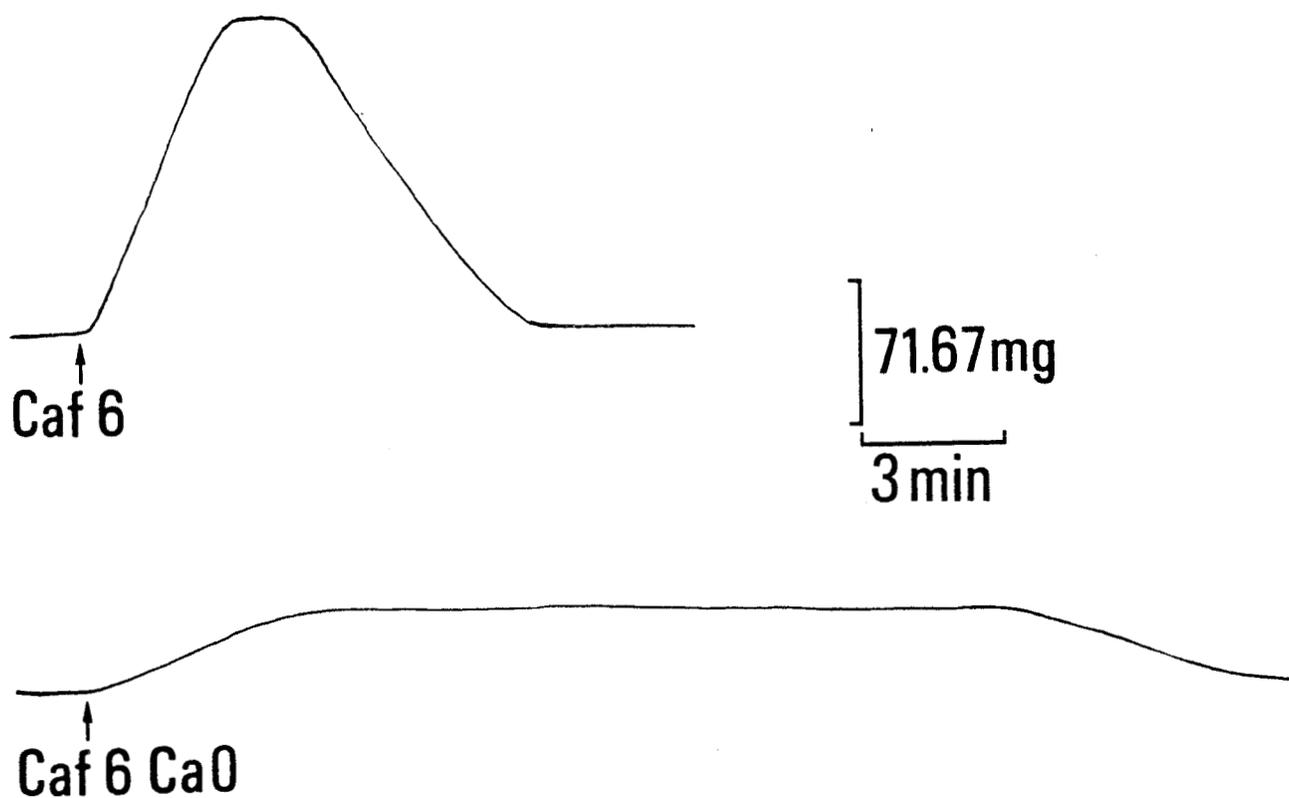


Figure 29 : Contractures caféiniques obtenues sur fibre intacte.

En haut : contracture induite par une solution ASW additionnée de caféine 6 mM (Caf 6).

En bas : contracture induite par une solution ASW dépourvue de calcium et additionnée de caféine 6 mM (Caf 6 Ca0). Les flèches indiquent le moment d'application de la solution.

L'ordre de la figure correspond à l'ordre du protocole expérimental.

Les enregistrements illustrés ont été retracés à partir des enregistrements originaux.

Fibre n° 280978.

de calcium extracellulaire et non à un épuisement du calcium présent dans le RS après le développement de la première contracture, l'expérience inverse a été effectuée (Fig. 30). On observe tout d'abord le développement d'une contracture d'amplitude égale à 34.40 mg en milieu dépourvu de calcium suivi d'une contracture d'amplitude égale à 154.08 mg après l'application du milieu Caf 6 mM. Les résultats moyens obtenus sur 3 fibres donnent les valeurs de 28.00 ± 4.52 mg ($\bar{x} \pm$ SEM) et 164.12 ± 7.10 mg ($\bar{x} \pm$ SEM) en absence puis en présence de calcium extracellulaire.

CONCLUSION

A l'issue des expériences effectuées sur les fibres musculaires *intactes* du Crabe *Carcinus maenas*, on peut conclure que i) le calcium extracellulaire est indispensable au développement d'une activité mécanique induite par une dépolarisation membranaire et qu'il participe très largement au développement d'une contracture caféinique, ii) le réticulum sarcoplasmique joue un rôle de tout premier plan dans l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, iii) le mécanisme de libération du calcium serait très certainement de type "calcium-induced calcium release" puisque d'une part l'activité mécanique résultant d'une dépolarisation membranaire (T_1 et T_2) est inhibée en présence de procaine drogue connue pour inhiber le mécanisme de Ca-induced Ca release et d'autre part, la caféine, drogue connue pour induire un largage à partir du RS mais surtout pour stimuler le mécanisme de Ca-induced Ca release, permet le développement d'une contracture très nettement augmentée quand le calcium est présent dans le milieu extracellulaire.

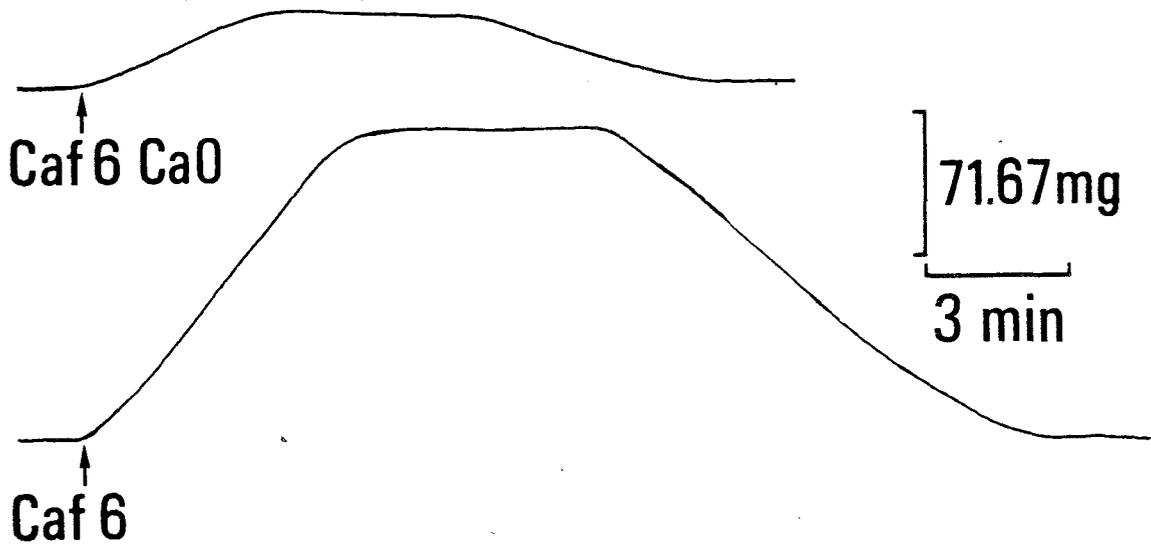


Figure 30 : Contractures caféiniques obtenues sur fibre intacte.

En haut : contracture induite par une solution ASW dépourvue de calcium et additionnée de caféine 6 mM (Caf 6 Ca0).

En bas : contracture induite par une solution ASW additionnée de caféine 6 mM (Caf 6).

Les flèches indiquent le moment d'application de la solution.

L'ordre de la figure correspond à l'ordre du protocole expérimental.

Les enregistrements illustrés ont été retracés à partir des enregistrements originaux.

Fibre n° 300978.

Afin d'apporter de nouveaux supports expérimentaux à cette hypothèse et d'affiner la nature de ce mécanisme, il m'est apparu nécessaire d'ôter le sarcolemme des fibres (fibres pelées) pour contrôler et modifier le milieu environnant la membrane du RS. Les résultats suivants ont été obtenus sur ce type de préparation.

CARACTERISTIQUES GENERALES OBTENUES SUR LES FIBRES MUSCULAIRES PELEES.

Avant d'exposer les résultats relatifs au mécanisme de "Ca-induced Ca release" il est important de déterminer certaines caractéristiques de fonctionnement du réticulum sarcoplasmique et des protéines contractiles.

I - FONCTIONNEMENT DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE

Le protocole expérimental-type de nos expériences est le suivant : une fois montée dans la cuve expérimentale et lavée deux fois à l'aide de la solution de lavage ("Wash" = W) afin d'ôter toute trace d'EGTA dans le milieu environnant la fibre, le RS est chargé pendant un temps variable en calcium à l'aide d'une solution de concentration calcique telle que $pCa = 6.6$. Pour cette valeur de pCa il n'y a pas d'activation directe des protéines contractiles. La fibre est à nouveau lavée deux fois afin d'ôter toute trace d'ions Ca, puis l'activité de largage est testée par la caféine. La caféine est, nous l'avons vu, un alcaloïde connu pour induire un largage calcique à partir du RS. La libération de calcium provoque une contraction musculaire qui est relâchée à l'aide de la solution relaxante R.

Différents paramètres constituant un indice de fonctionnement du RS peuvent être déterminés en modulant le protocole exposé ci-dessus. Notamment, des indices de la perméabilité calcique du RS et du fonctionnement de l'ATPase calcique du RS peuvent être obtenus.

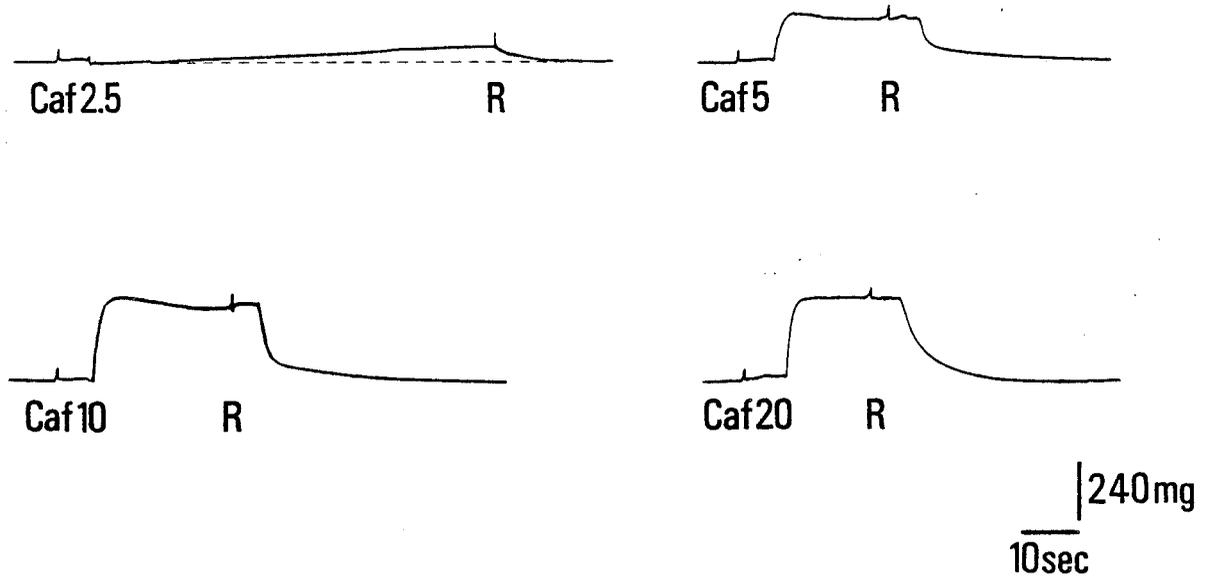


Figure 31 : Relation effet-dose de caféine.

Enregistrements des contractions induites par des concentrations variées de caféine (Caf X, $2.5 \text{ mM} \leq X \leq 20 \text{ mM}$) après charge calcique maximale du RS. Les contractions sont relâchées à l'aide de la solution relaxante, R.

Fibre n° 131084.

A - Perméabilité calcique du RS

Pour une charge donnée du RS en calcium pendant un temps donné (pCa 6.6, 5 min), la quantité de Ca libérée et corrélativement l'amplitude de la contraction dépendent de la concentration en caféine.

La relation effet-dose de la caféine nous permettra de déterminer la dose seuil de caféine nécessaire pour induire une tension ainsi que la concentration de caféine pour laquelle la tension caféinique est maximale. Ces paramètres constituent un indice de la perméabilité du RS.

1. Analyse des enregistrements

L'expérience permettant l'établissement de la courbe effet dose est illustrée à la figure 31. Des concentrations croissantes de caféine (2.5, 5, 10 et 20 mM) ont été appliquées après une charge calcique préalable maximale du RS (pCa 6.6, 5 min). La contraction est relâchée à l'aide de la solution relaxante sinon elle reste maintenue quelle que soit la concentration caféinique utilisée. On observe que plus la concentration est élevée plus la tension caféinique se développe rapidement et plus son amplitude est élevée. En effet, le temps de mise sous tension maximale évolue de 63 sec à 3.5 sec et l'amplitude de 72 à 348 mg, quand la concentration de caféine passe de 2.5 mM à 20 mM. La contraction caféinique est presque maximale (336 mg) pour une concentration de 10 mM.

2 - Courbe effet-dose

Les résultats de la figure 31 sont résumés sur la courbe effet-

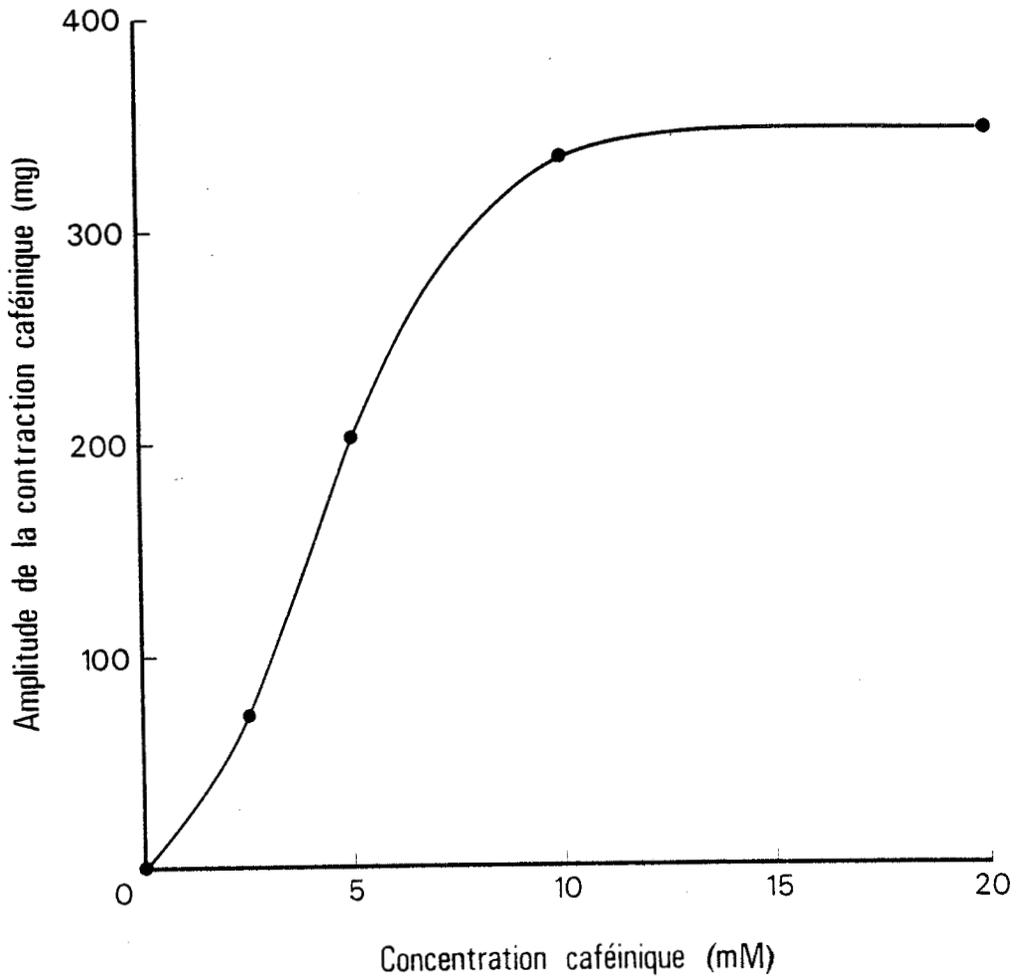


Figure 32 : Relation effet-dose de caféine. Courbe traduisant l'évolution de l'amplitude des tensions caféiniques (mg) en fonction de la concentration de caféine utilisée (mM). Temps de charge constant en solution pCa 6.6 durant 5 minutes.

Même fibre qu'à la figure 31.

dose (Fig. 32). L'amplitude de la contraction, image de l'amplitude de la libération calcique, est reportée en fonction de la concentration caféinique utilisée. On observe que plus la concentration caféinique est élevée, plus l'amplitude de la contraction est importante et atteint un maximum pour des concentrations de caféine supérieures à 10 mM. Les amplitudes sont respectivement égales à 72, 204, 336 et 348 mg pour 2.5, 5, 10 et 20 mM. Les moyennes obtenues sur n fibres sont reportées sur le tableau ci-dessous.

Caf mM	n	T _{mg}
20	4	366.00 +/- 12.73
10	4	396.00 +/- 70.74
5	4	308.00 +/- 42.46
2.5	8	96.00 +/- 20.78



Les résultats sont présentés sous la forme $\bar{x} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ (erreur standard par rapport à la moyenne).

T exprime l'amplitude de la contraction en mg.

La valeur moyenne de l'amplitude de la contraction induite par Caf 20 mM est inférieure à celle de l'amplitude de la contraction induite par Caf 10 mM. L'application du test de student donne un résultat tel que p est compris entre 0.9 et 0.5. Les amplitudes moyennes de ces deux contractions ne sont donc pas significativement différentes. Ultérieurement, dans nos expériences nous utiliserons, pour induire une contraction caféinique

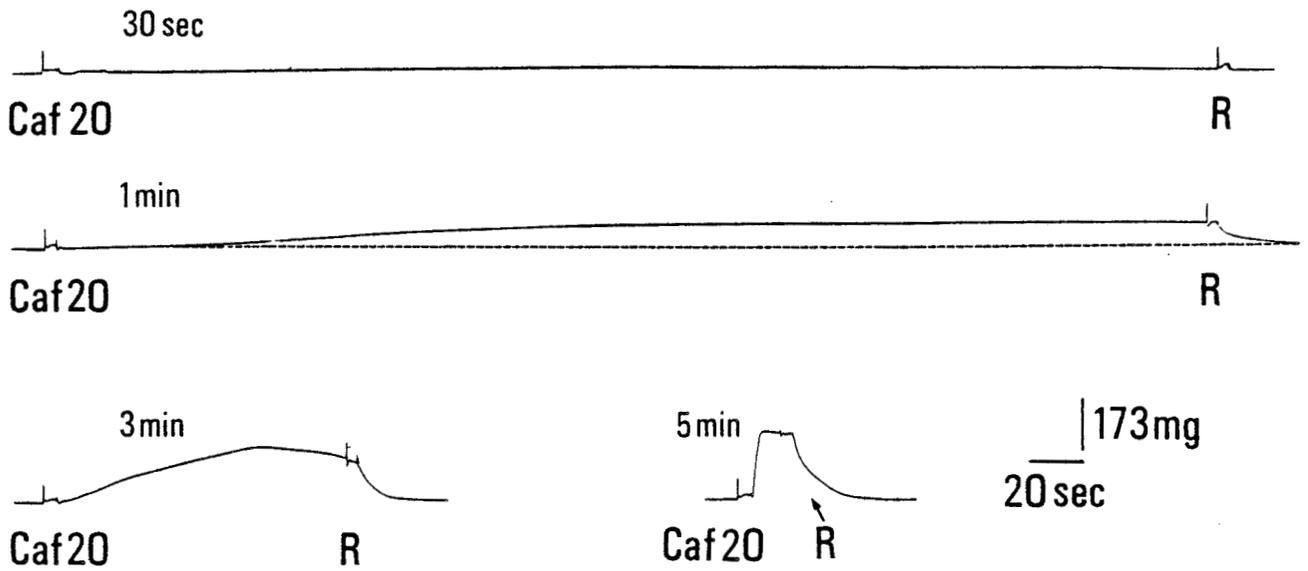


Figure 33 : Influence de la variation du temps de charge.

Enregistrements des contractions induites par une solution caféinique 20 mM (Caf 20) après charge calcique variable du RS. Les temps de charge à l'aide de la solution pCa 6.6 sont indiqués au dessus des tracés. Les contractions sont relâchées à l'aide de la solution relaxante, R.

Fibre n° 070583.

maximale, une concentration égale à 20 mM pour laquelle la variation d'amplitude est moindre que celle observée pour 10 mM de caféine.

B - Pompage calcique par le RS

Pour une dose de caféine donnée (Caf 20 mM), le temps nécessaire pour que le RS se charge maximale constitue un contrôle de la capacité du RS à stocker le calcium et donc un contrôle du fonctionnement de l'ATPase calcique. Ce paramètre découle de l'établissement de la courbe reliant l'amplitude de la tension induite par la caféine au temps de charge c'est-à-dire au temps d'application de la solution pCa donnée.

1. Analyse des enregistrements

Les expériences ont été effectuées à l'aide de la caféine. Le protocole expérimental est le suivant : le RS est chargé par une solution de pCa = 6.6 pendant 30 sec, 1, 3, 5 et 10 minutes puis le largage est induit par une solution caféinique de concentration 20 mM connue pour induire une contraction maximale (voir Fig. 32). Les résultats illustrés à la figure 33 montrent que pour un temps de charge court de 30 sec aucune tension caféinique ne se développe. Pour des temps de charge supérieurs, plus le temps de charge est long plus la contraction caféinique est rapide et importante. L'amplitude est respectivement égale à 93.42, 188.14 et 224.9 mg pour 1 min, 3 min et 5 min de temps de charge. Pour un temps de charge de 1 min il existe une latence au développement de la contraction d'une durée égale à 13 sec. Elle est nulle pour les deux autres temps de charge illustrés (3 min et 5 min). Le temps de mise sous tension maximale (latence

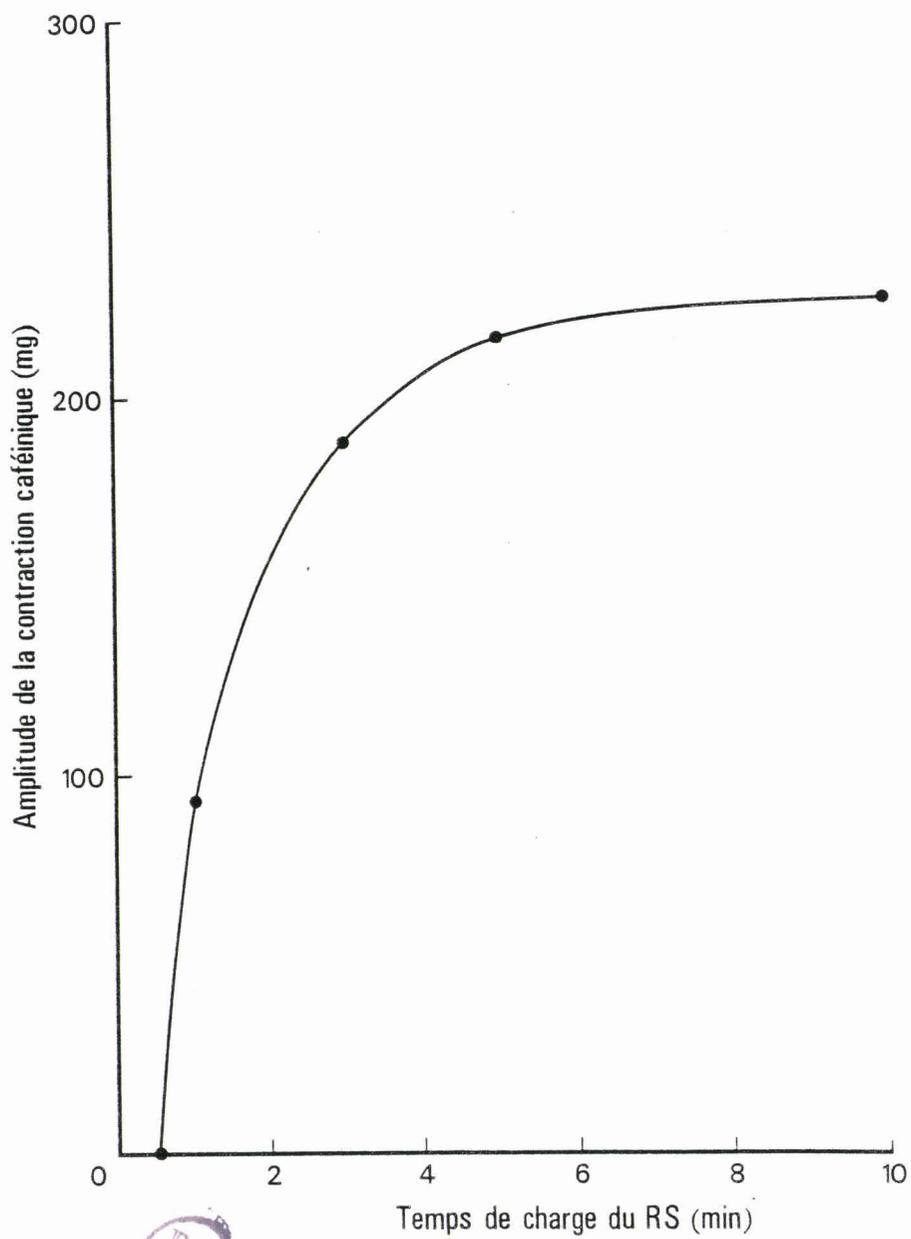


Figure 34 : Influence de la variation du temps de charge.

Courbe traduisant l'évolution de l'amplitude de la contraction caféinique maximale (ordonnée) en fonction du temps de charge du RS.

Même fibre qu'à la figure 33.

incluse) est respectivement égal à 430 sec, 79 sec et 4.5 sec pour 1,3 et 5 min de temps de charge. Notons ici qu'une tendance à la relaxation existe pour 1 et 3 min de charge alors que la contraction est maintenue pour 5 min de charge. Bien que ce phénomène soit peu visible sur l'illustration puisque nous avons rapidement appliqué la solution relaxante afin d'éviter une détérioration trop rapide de la fibre, d'autres expériences montrent que cette contraction peut être maintenue pendant 2 minutes (non illustré). Plus tard, il y a généralement cassure de la fibre à cause de sa fragilité augmentée lorsqu'elle développe une contraction importante.

2. Courbe tension-variation du temps de charge

Les résultats de la figure 33 sont résumés sur la courbe reliant l'amplitude de la contraction au temps de charge calcique c'est-à-dire à l'amplitude de la charge calcique (SORENSEN et coll., 1980) (Fig. 34). On observe que plus la charge calcique est importante plus le largage est important puisque l'amplitude de la contraction caféinique varie de 0 mg pour 30 sec de charge à 233 mg pour 10 min de charge. Nous notons l'amorce d'un plateau quand le temps de charge est proche de 5 min. Des résultats comparables ont été obtenus sur 3 autres fibres. Il faut cependant noter que sur certaines fibres le plateau n'est atteint que pour des temps de charge proche de 10 minutes. Après analyse minutieuse des résultats, il semblerait que cette différence ne soit pas due à l'existence de deux types de fibres présentant une vitesse d'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase calcique différente mais plus à une conséquence d'une variation de température lors de l'expérimentation. En effet, les fibres présentant

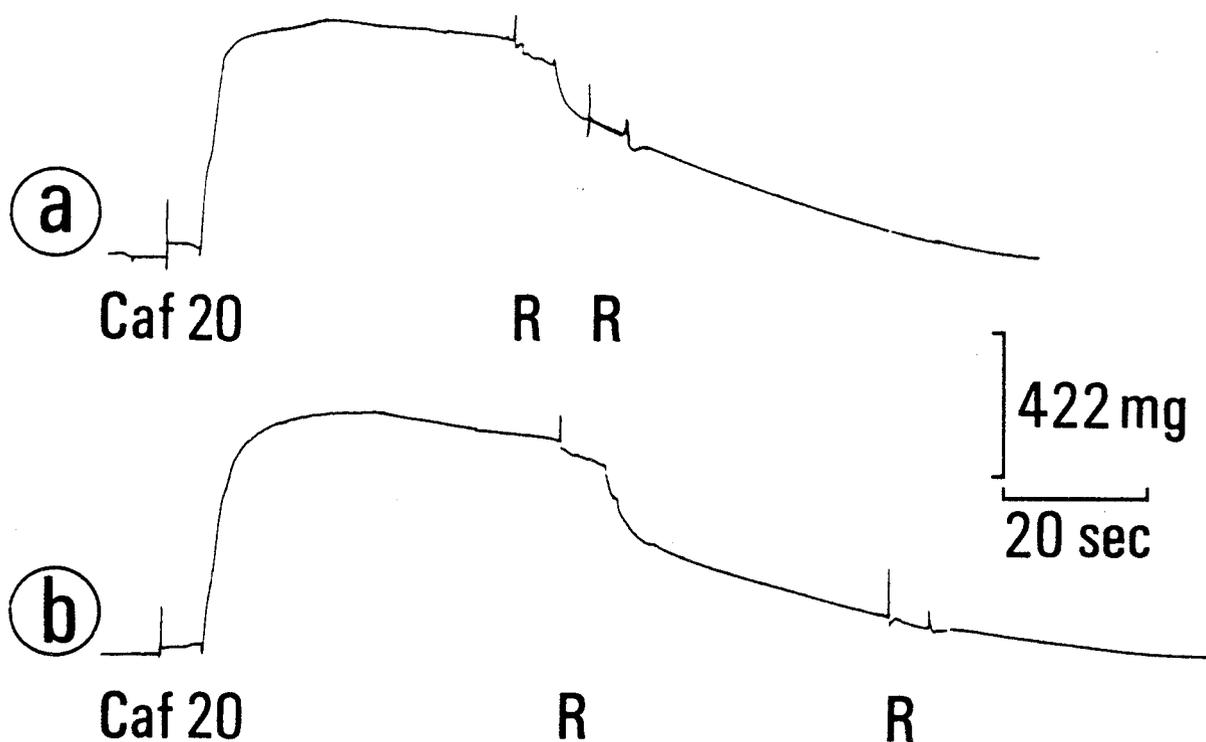


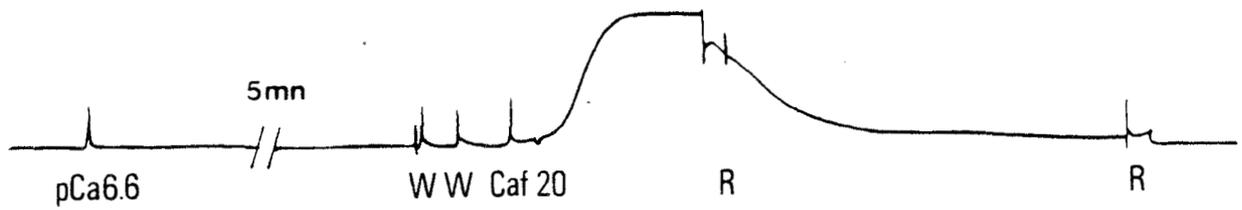
Figure 35 : Comparaison de deux contractions consécutives (a puis b) induites par une même concentration caféinique (Caf 20) après une charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 min), non illustré sur la figure. La relaxation est induite par plusieurs applications de la solution R.

Fibre n° 031285.

une amplitude caféinique maximale pour un temps de charge de 10 minutes ont été expérimentées dans un local non thermorégulé à une période de l'année particulièrement froide. La température en cours d'expérience avoisinait 14°C. Par contre les autres fibres ont été expérimentées soit dans cette pièce à 17-18°C soit dans le nouveau local thermorégulé à 17°C. Ce résultat n'est donc pas paradoxal puisque l'on sait que toute activité enzymatique et donc l'activité de l'ATPase calcique est dépendante de la température. De plus, l'activité ATPasique étant évaluée de façon indirecte par le développement de la contraction, il ne faut pas négliger la dépendance de l'activité ATPasique de la myosine vis à vis de la température. Cette activité diminue quand la température diminue et présente un Q_{10} égal à 1.41 (GODT et LINDLEY, 1982).

C - Comparaison de deux contractions consécutives

Notre préparation biologique est fragile car dépouillée de la structure élastique que constitue le sarcolemme, elle cède rapidement aux tensions isométriques auxquelles elle est soumise. Cette fragilité nous a conduit à vérifier que deux contractions successives sont comparables c'est-à-dire que la fibre répond de façon similaire à des sollicitations identiques. L'expérience ayant permis cette vérification est illustrée à la figure 35. Elle a consisté à charger maximalelement le RS et à induire un largage calcique maximal, à l'aide d'une solution caféinique 20 mM. Deux applications successives de ce protocole ont été effectuées. L'analyse des contractions induites montrent que leurs cinétiques et leurs amplitudes



Après traitement au brij

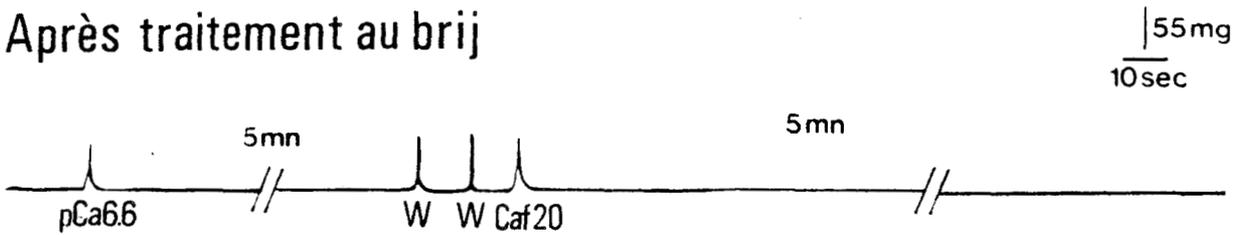


Figure 36 : Effet du traitement brij sur le réticulum sarcoplasmique.

En haut : avant le traitement au brij, contraction induite par une solution caféinique 20 mM (Caf 20) après charge calcique maximale (5 mn) du RS à l'aide de la solution pCa 6.6 ;

En bas : après traitement au brij, absence de contraction caféinique.

W indique l'application de la solution de lavage.

R indique l'application de la solution relaxante.

Fibre n° 250483.

sont comparables. En effet le temps de mise sous tension maximale est respectivement égal à 17 sec et 19 sec. Les amplitudes sont rigoureusement identiques (738 mg). Il s'en suit donc que toute modification importante de la cinétique ou de l'amplitude de contractions développées par une même fibre pourra être imputable aux modifications du protocole expérimental imposées par l'expérimentateur : variation du temps de charge, modification de la dose de caféine appliquée, ajout de drogues dans la solution de charge ou la solution caféinique.

D - Destruction du RS par un détergent : le brij 58.

Nous aurons besoin dans la suite de notre exposé des résultats de présenter des expériences ayant été effectuées après un traitement à l'aide du détergent bien connu : le brij 58. Cependant, il nous est nécessaire de contrôler qu'effectivement sur notre préparation et aux concentrations et durée d'action utilisées, le brij 58 détruit les fonctions du RS comme cela a été mis en évidence sur les fibres musculaires d'Ecrevisse (voir Matériel et Méthodes). L'expérience suivante a été faite (Fig. 36) : une solution de concentration caféinique égale à 20 mM est appliquée après avoir chargé de façon maximale le RS (pCa 6.6, 5 min). Ces deux conditions, nous le savons, permettent le développement d'une contraction maximale (voir Fig. 32 et Fig. 34). Il nous semblait en effet plus adéquat de tester l'effet du brij dans les conditions qui en présence du RS permettent le largage calcique le plus important. On observe le développement d'une contraction qui est relâchée par plusieurs applications de la solution relaxante. La fibre est ensuite traitée pendant 1 heure par une solution R

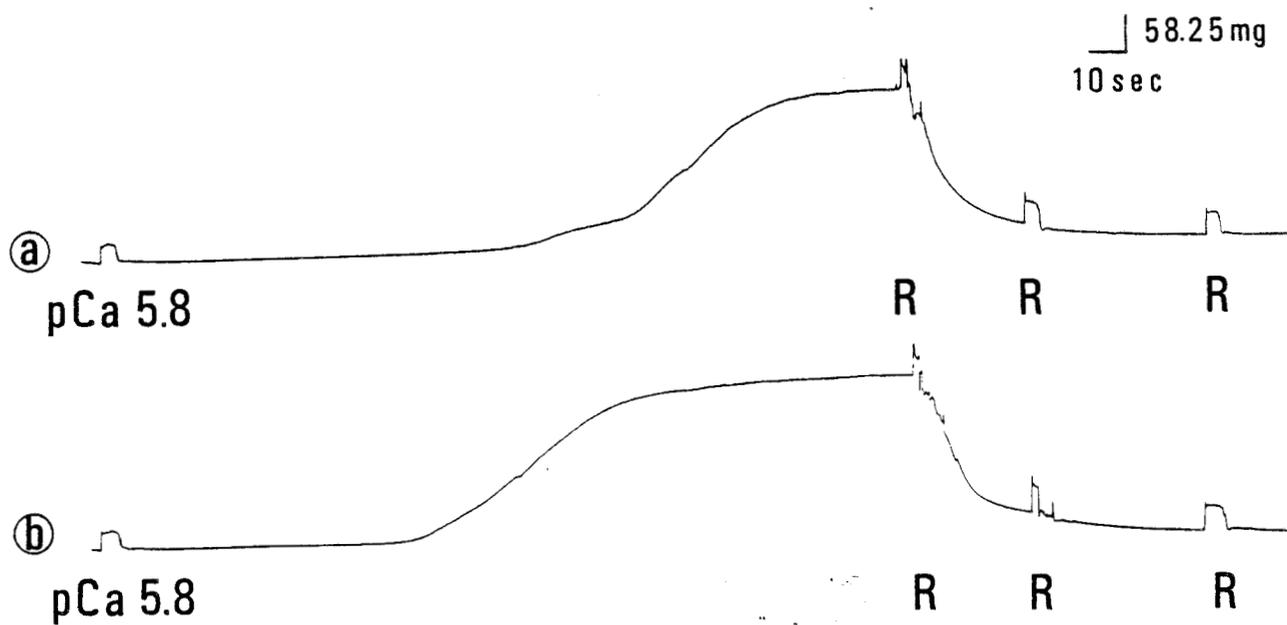


Figure 37 : Comparaison de deux contractions successives (a puis b) induites par une solution pCa 5.8. La relaxation est induite par plusieurs applications de la solution R.

Fibre n° 190685.

contenant 2 % de brij. Cette solution de brij doit être très souvent renouvelée car la destruction du RS entraîne une libération de calcium dans le milieu environnant les protéines contractiles, et cette libération induit le développement d'une contraction de longue durée qui fragilise la fibre. Lorsque le traitement au brij est terminé, la fibre est lavée une dizaine de fois à l'aide de la solution de lavage, afin d'éliminer toute trace de détergent. Ensuite, le même protocole expérimental que précédemment est effectué. On observe qu'aucune tension caféinique ne se développe même après 5 minutes de bain dans la solution caféinique (20 mM). Ce résultat est une preuve que le RS n'est plus fonctionnel après un traitement au brij 2 % pendant 1 heure.

II - LES PROTEINES CONTRACTILES

Notre préparation biologique étant fragile, nous avons, comme dans le paragraphe précédent testé la reproductibilité de deux contractions consécutives. De plus, un autre contrôle préalable a été effectué : vérifier que le RS n'intervient pas en modifiant la concentration calcique au niveau des protéines contractiles.

A - Contrôles expérimentaux

1. Comparaison de deux contractions

La figure 37 illustre les réponses mécaniques d'une même fibre,

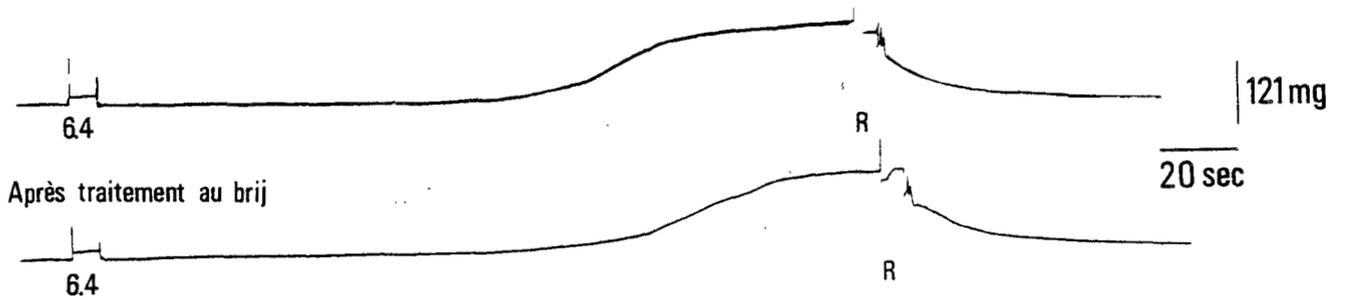


Figure 38 : Contrôle de la non-intervention du réticulum sarcoplasmique. Contraction induite par une solution pCa 6.4, avant et après traitement au brij. La relaxation est induite par plusieurs applications de la solution R.

Fibre n° 130484.

induites par une solution de concentration calcique pCa 5.8. Cette concentration calcique a été choisie car elle est suffisante pour saturer les sites calciques de la troponine et permet le développement d'une contraction maximale (voir Fig. 40). Les résultats montrent que les deux contractions successives sont sensiblement identiques, tant en tension qu'en cinétique. En effet, les caractéristiques de la première contraction sont les suivantes : amplitude, 236 mg ; latence, 100 sec ; temps de mise sous tension maximale, 98 sec. Celles de la seconde contraction sont respectivement égales à 237 mg, 85 sec et 121 sec. Constatant cela, tout changement dans la seconde contraction, lors de l'application d'un milieu physiologique modifié par une drogue, pourra être attribué à l'effet de cette drogue et non à une détérioration de l'état physiologique de la préparation.

2. Contrôle de la non-intervention du réticulum sarcoplasmique

Nous savons (voir Historique) que le RS joue un rôle capital dans la régulation du calcium, permettant en particulier la relaxation du muscle en captant activement le calcium sarcoplasmique et en l'accumulant.

Il est bien évident qu'en cas d'apport calcique sur la face sarcoplasmique de la membrane réticulaire, les mécanismes de pompage du RS risquent d'être activés. A l'inverse, la théorie "Ca-induced-Ca release" permet d'envisager qu'un apport de calcium sensé tester l'activité des protéines contractiles induirait un largage à partir du RS.

C'est pourquoi nous nous assurons que le RS ne modifie pas la réponse contractile induite par diverses solutions pCa. Pour cela, comme nous venons de l'indiquer, il est possible de détruire le RS en imposant à la fibre pelée un bain d'une heure dans une solution de brij à 2 %.

Afin d'effectuer ce contrôle expérimental, une solution de concentration calcique pCa 6.4 a été appliquée avant et après traitement au brij. La concentration calcique de pCa 6.4 a été choisie car elle ne permet pas le développement d'une contraction maximale (voir Fig. 40). De ce fait, toute augmentation ou diminution de l'amplitude de la contraction après destruction du RS sera détectable. Avant traitement au brij, on observe (Fig. 38) qu'après une latence de 98 secondes, une tension se développe avec un temps de mise sous tension maximale égal lui aussi à 98 secondes et atteint un plateau d'une amplitude de 121 mg. La fibre est ensuite relâchée par plusieurs applications de solution relaxante (R) puis traitée pendant 1 heure par une solution R contenant 2 % de brij. Cette solution de brij est très souvent renouvelée afin d'éviter une fragilisation de la fibre due à la libération de calcium dans le milieu environnant les protéines contractiles. Lorsque le traitement brij est terminé, la fibre est lavée une dizaine de fois à l'aide de la solution de lavage, afin d'éliminer toute trace de détergent. Ensuite, une solution pCa 6.4 est à nouveau appliquée. On observe qu'après une latence de 102 sec, une tension d'amplitude égale à 119 mg se développe avec un temps de mise sous tension maximale égal à 100 sec.

On peut conclure que la présence du RS non chargé en calcium par l'expérimentateur modifie peu l'amplitude de l'activité mécanique des protéines contractiles ainsi que la cinétique du développement de la tension.

B - Dépendance calcique de la contraction

Afin de tester l'affinité des protéines contractiles pour le calcium, leur sensibilité au calcium et leur capacité à développer une tension mécanique, des solutions de concentrations calciques variées, exprimées en unité pCa ($pCa = - \log [Ca]$), sont appliquées sans charge préalable du RS.

La fibre, montée dans la solution relaxante R, est lavée deux fois (solution Wash ou W) puis la contraction est provoquée par l'application d'une solution dite pCa X ($X = 7.0$ à 4.8). Une fois le plateau atteint, la fibre est relâchée par la solution R renouvelée si nécessaire jusqu'au retour au niveau de base. La réponse contractile est estimée directement grâce au matériel décrit précédemment.

Une courbe de la tension en fonction de pCa est construite. Elle permet, par la détermination de la valeur de pCa pour laquelle la contraction est égale à 50 % de la tension maximale (pCa_{50}), d'évaluer l'affinité de la troponine pour le calcium : plus la valeur de pCa_{50} est élevée, plus l'affinité est importante (FUCHS, 1977). Elle permet également d'évaluer la sensibilité des protéines contractiles au calcium par la détermination de la valeur de pCa pour laquelle la plus petite contraction se développe : plus

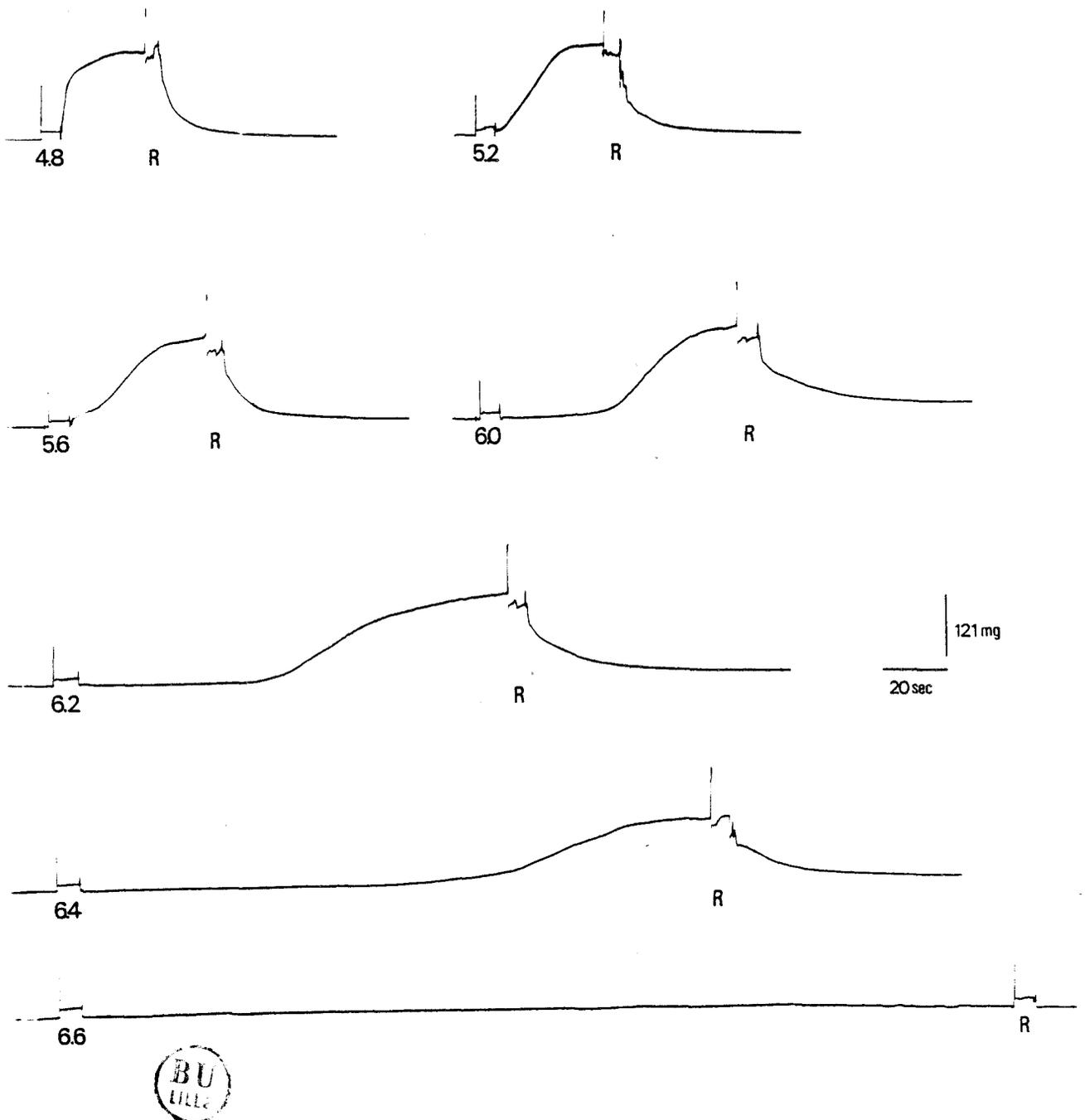


Figure 39 : Dépendance calcique de la contraction.

Tracés des contractions induites par des solutions de pCa variées sans charge préalable du RS. Le moment précis d'application des solutions correspond à la deuxième déflexion rapide avant le déclenchement de la contraction. Les tensions sont relâchées par la solution relaxante R.

Fibre n° 160484.

cette pCa est élevée, plus les protéines contractiles sont sensibles au calcium. Enfin, la concentration calcique nécessaire à une contraction maximale est déterminée.

1. Analyse des enregistrements

La figure 39 illustre les contractions obtenues sur une même fibre pour des pCa variées. On observe que plus la pCa est faible plus l'amplitude de la contraction est élevée et plus le temps de mise sous tension maximale est réduit. D'autre part, la latence existant pour des pCa de 6.6 à 6.0 diminue quand la pCa diminue pour être nulle pour des pCa inférieures à 6.0. L'amplitude varie de 0 à 173.94 mg et le temps de mise sous tension maximale auquel est ajouté la latence varie de 192 à 19 sec quand la pCa diminue. Notons que l'ensemble des contractions obtenues sont des contractions maintenues.

2. Courbe tension-pCa

Les amplitudes des contractions illustrées à la figure 39 sont reportées en fonction de la pCa appliquée (Fig. 40). Le seuil de déclenchement de la contraction se situe pour une pCa égale à 6.6. Puis, plus la pCa est faible, plus l'amplitude de la tension est grande ; elle atteint un maximum pour une pCa voisine de 5.6. Ce maximum se maintient pour des pCa plus faibles. Des résultats qualitativement comparables ont été obtenus sur 4 autres fibres. Cependant, les valeurs absolues des amplitudes sont très variables d'une fibre à l'autre. D'autre part, l'allure très elliptique des fibres musculaires pelées de crabe ne nous a pas permis d'exprimer de façon satisfaisante l'amplitude des contractions en kg/cm^2 .

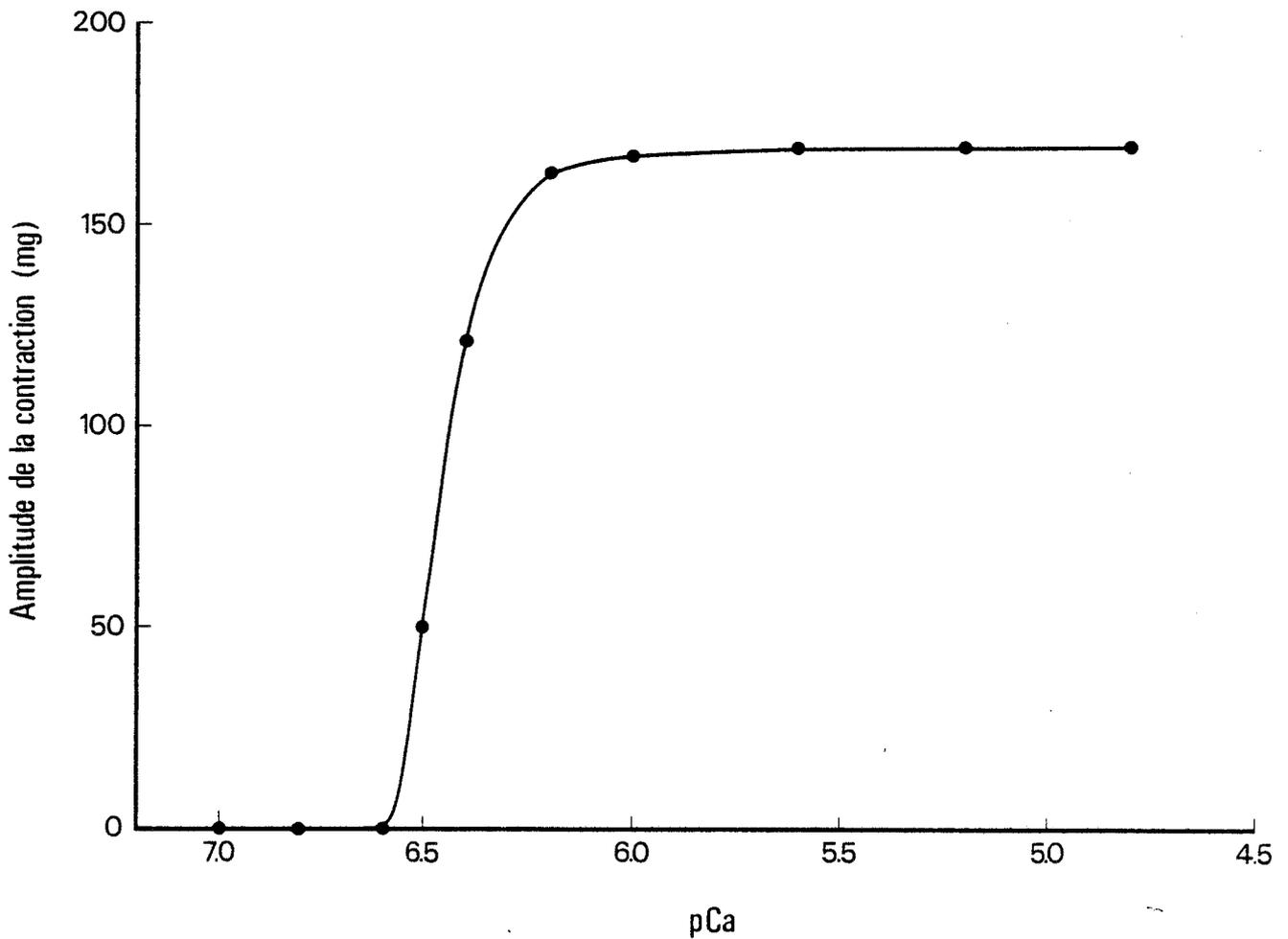


Figure 40 : Dépendance calcique de la contraction.

Relation entre l'amplitude de la contraction exprimée en mg (ordonnée) et la concentration calcique des solutions appliquées, exprimée en pCa (abscisse).

Même fibre qu'à la figure 39.

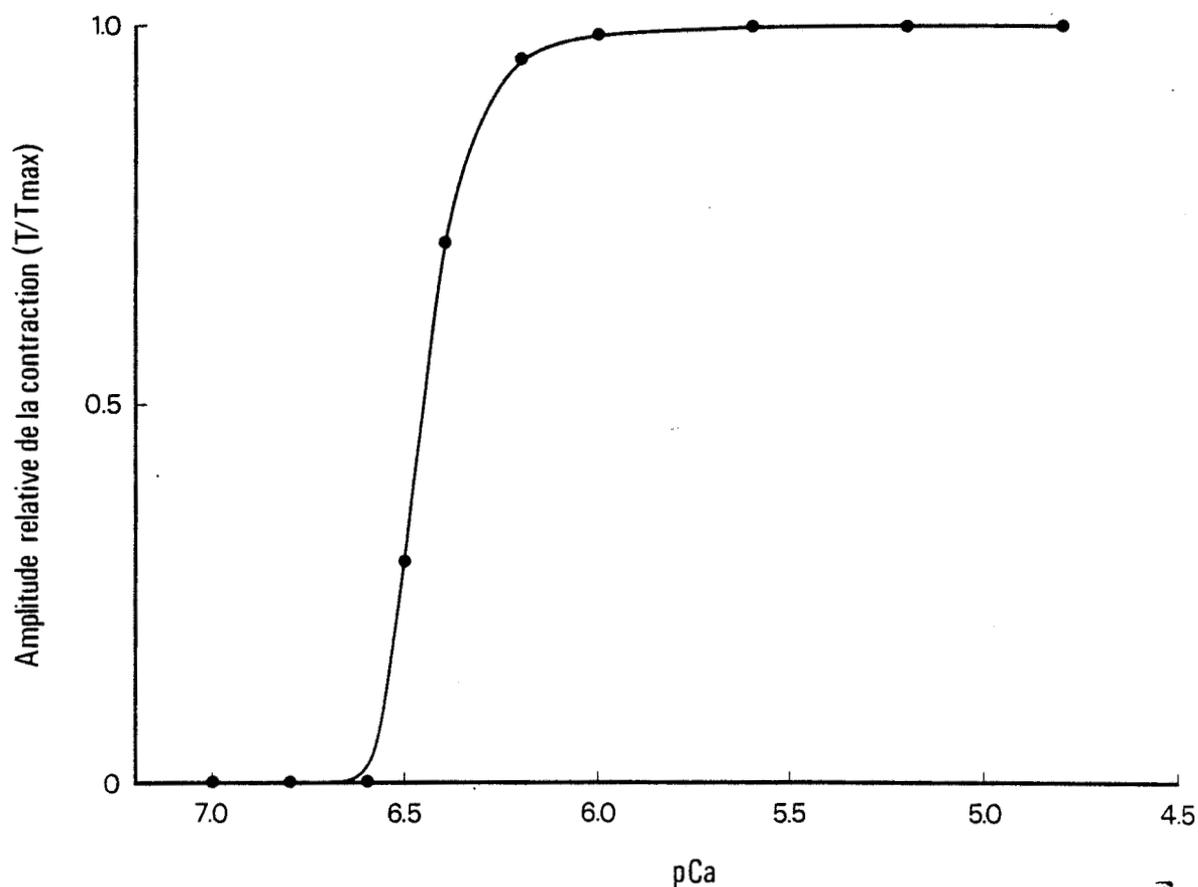
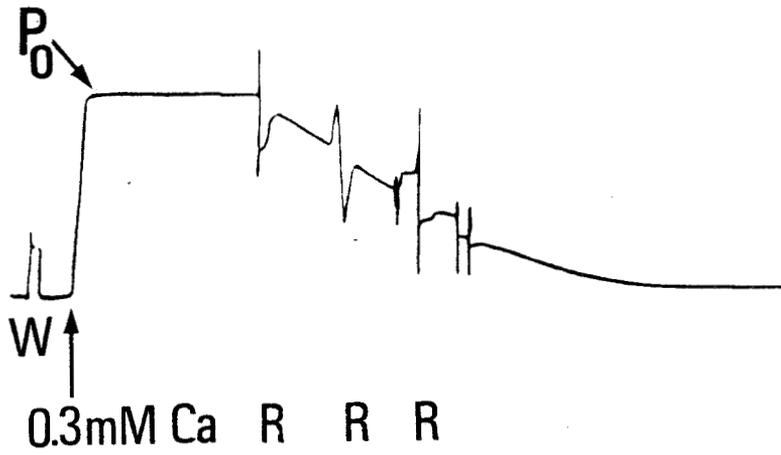


Figure 41 : Dépendance calcique de la contraction.

Relation entre l'amplitude de la contraction (T), exprimée par rapport à la contraction maximale (T_{max}) (ordonnée, T/T_{max}), en fonction de la pCa des solutions (abscisse).

Même fibre qu'aux figures 39 et 40.



Après traitement au brij

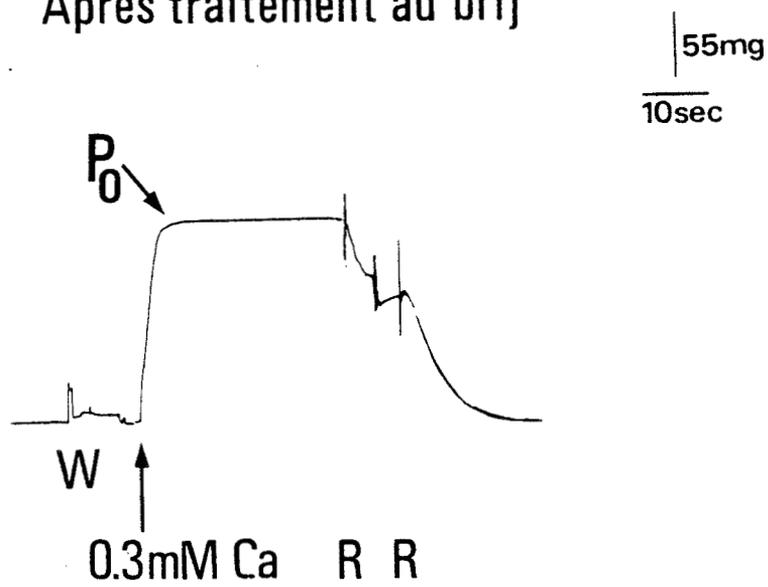


Figure 42 : Absence d'effet du traitement brij sur les protéines contractiles.

En haut : contraction calcique maximale (P_0) avant le traitement au brij.

En bas : contraction calcique maximale (P_0) après le traitement au brij.

Fibre n° 281082.

Le report des amplitudes de tension exprimées en pourcentage de la tension maximale (T_{\max}) (Fig. 41) outre les informations reportées ci-dessus nous donne la valeur de pCa pour laquelle la tension est égale à 50 % de la tension maximale (pCa_{50}). Elle est égale à 6.45. Le calcul du coefficient de Hill donne une valeur de 4.50. L'existence d'une valeur du coefficient de Hill supérieure au nombre de sites calciques existant sur la troponine C sera discutée dans le chapitre discussion.

3. Activité mécanique maximale

L'activité mécanique maximale est testée par l'application d'une solution de concentration calcique largement suffisante pour saturer les sites calciques de la troponine (Fig. 42). Sur notre préparation biologique nous utilisons 0.3 mM Ca diluées dans la solution de lavage. Dans ces conditions une contraction appelée P_0 se développe rapidement (temps de mise sous tension maximale égal à 4 sec) et atteint un plateau d'amplitude égale à 186.5 mg. La fibre se relâche quand la solution R est appliquée. La moyenne obtenue sur 6 fibres est telle que P_0 est égal à 195.62 ± 20.17 mg (mean \pm SEM). Bien que le contrôle de l'absence d'effet du brij sur une contraction submaximale ait été fait (voir Fig. 38) nous avons voulu vérifier l'absence d'effet du détergent sur la contraction maximale. On observe effectivement (Fig. 42) qu'après un bain d'une solution contenant du brij 2 % pendant une heure, la contraction maximale induite par 0.3 mM Ca est d'amplitude équivalente à P_0 avant brij : elle est égale à 187 mg. Le développement de la contraction est cependant ralenti puisque le temps de mise sous tension maximale est égal à 9.5 sec. Cependant, ce ralentissement

n'a pas toujours été observé et ne semble pas être une conséquence de la destruction du RS. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'expérience illustrée à la figure 38 puisque la contraction induite par une solution pCa 6.4 n'est pas ralentie après la destruction fonctionnelle du RS.

En conclusion, le réticulum sarcoplasmique dans sa fonction de largage et de capture du calcium et les protéines contractiles dans leur capacité à développer une contraction, sont fonctionnels sur les fibres mécaniquement pelées de crabe et dans les conditions expérimentales utilisées. De plus, le brij appliqué à une concentration de 2 % pendant 1 heure détruit fonctionnellement le RS sans affecter les propriétés des protéines contractiles.

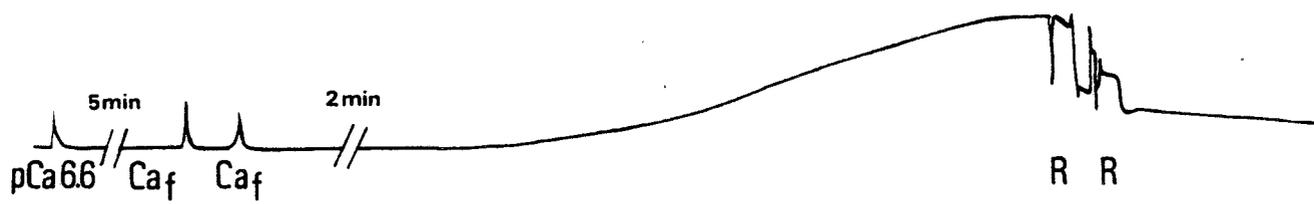
MISE EN EVIDENCE D'UN LARGAGE CALCIQUE INDUIT PAR DES CATIONS DIVALENTS.

I - ROLE DU CALCIUM*

A - Largage induit par une solution d'activité calcique faible

Afin de savoir si une solution d'activité calcique faible peut induire un largage calcique à partir du réticulum sarcoplasmique, l'expérience suivante a été effectuée (Fig. 43). Le réticulum sarcoplasmique est chargé par une solution pCa 6.6 pendant 5 minutes. Ce temps est nous l'avons vu suffisant pour induire une charge calcique maximale (voir Fig. 34). Ensuite la solution de lavage (W) est appliquée 2 fois afin d'éliminer toute trace de calcium de la solution précédente. Enfin la fibre est baignée par une solution d'activité calcique faible (Ca_f). On observe en haut de la figure 43 qu'une tension se développe lentement. Ses caractéristiques sont les suivantes : latence, 140 sec ; temps de mise sous tension maximale, 145 sec ; amplitude, 184.25 mg. La contraction est maintenue jusqu'à ce que la solution relaxante, R, soit appliquée plusieurs fois. Les résultats obtenus sur 5 fibres donnent les moyennes suivantes (moyennes $\pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$) : latence 87.75 \pm 26.39 sec ; temps de mise sous tension maximale, 162.33 \pm 8.77 sec ; amplitude, 187.55 \pm 10.96 mg. L'amplitude de la contraction induite par la solution d'activité calcique faible, exprimée en pourcentage

* Cette étude a fait l'objet de la publication d'un article (GOBLET et MOUNIER, 1986).



Après traitement au brij

55mg
10sec

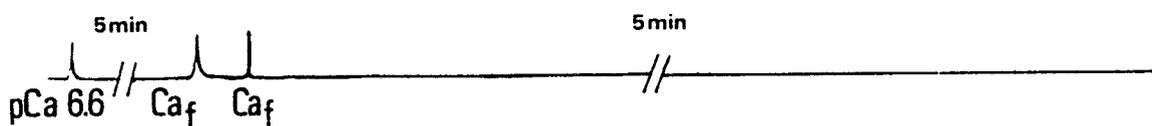


Figure 43 : Mécanisme de "Ca-induced Ca release".

En haut : avant traitement au brij, contraction induite par une solution de concentration calcique faible (Ca_f) après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn). La contraction est relâchée par la solution relaxante, R.

En bas : après traitement au brij, absence de contraction en présence de la solution de concentration calcique faible.

Fibre n° 191182.

de la contraction maximale que les protéines contractiles peuvent développer (P_0) est égale à 95.87 % P_0 .

Afin de s'assurer que cette contraction induite par Ca_f est une conséquence d'un largage calcique et non d'une activation directe des protéines contractiles par le calcium présent dans la solution, la même expérience que celle décrite ci-dessus a été effectuée après avoir fait subir à la fibre un traitement à l'aide d'un détergent : le brij 58 à une concentration de 2 % pendant une heure. En effet, nous avons vu précédemment que le brij détruit les diverses fonctions du réticulum sarcoplasmique (voir Fig. 36) sans modifier l'aptitude des protéines contractiles à développer une activité mécanique (voir Fig. 42). Dans ces conditions, quand la solution d'activité calcique faible est appliquée aucune contraction ne peut être enregistrée même après 5 minutes de bain (Fig. 43, en bas).

La détermination de l'activité calcique de la solution d'activité calcique faible a été effectuée à l'aide d'une électrode sensible au calcium (ORION). Les valeurs varient entre $1.6 \cdot 10^{-7}$ M et $1.25 \cdot 10^{-7}$ M.

En conclusion, une concentration calcique aussi faible que $1.6 \cdot 10^{-7}$ à $1.25 \cdot 10^{-7}$ M insuffisante pour activer directement les protéines contractiles induit un largage calcique à partir du RS. Le mécanisme de libération du calcium par le RS sur les fibres musculaires de crabe serait de type "Ca-induced Ca release".

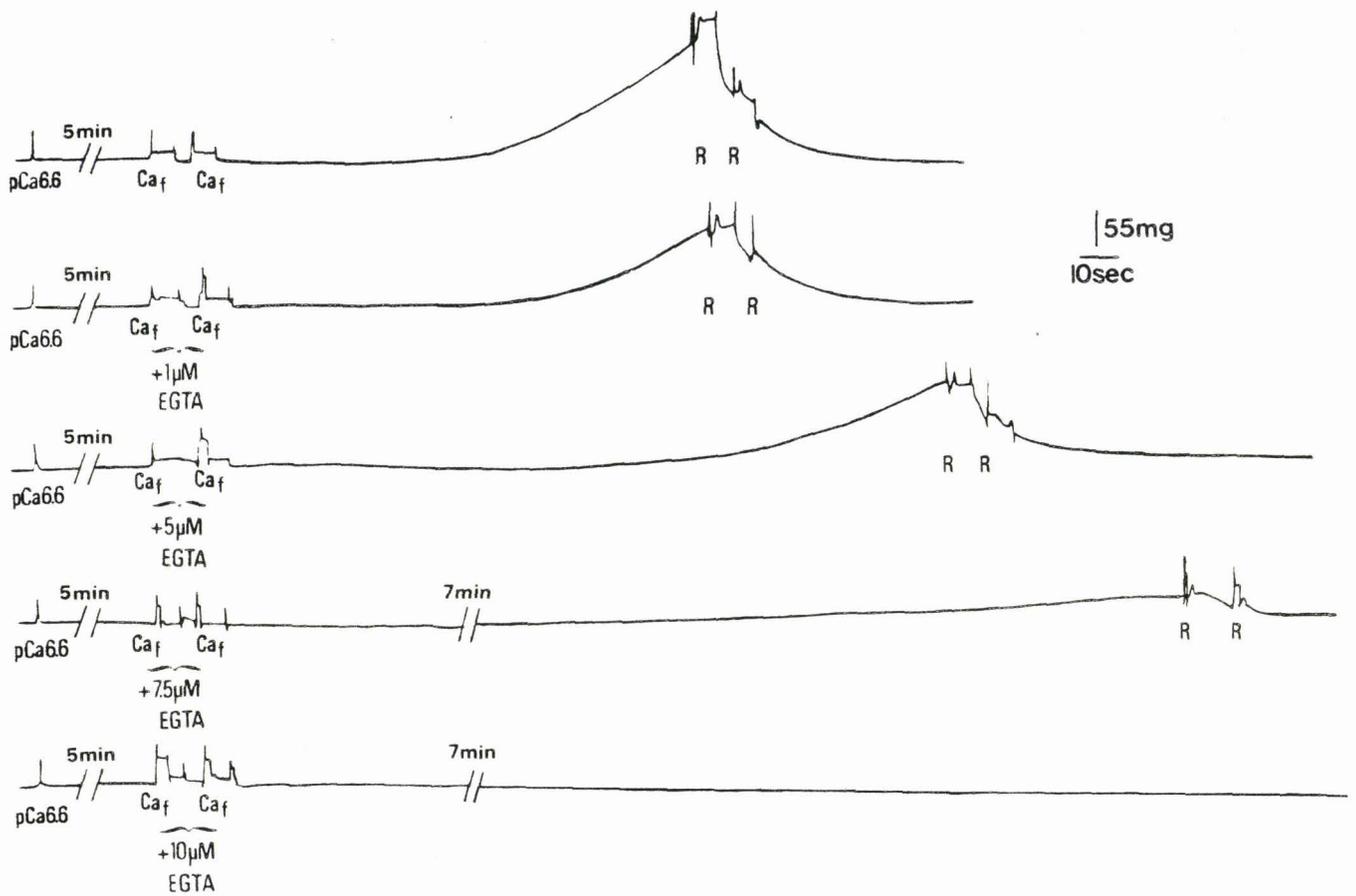


Figure 44 : Détermination de l'activité calcique minimale pouvant induire une libération calcique à partir du réticulum sarcoplasmique. De haut en bas tensions induites, après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn), par la solution de concentration calcique faible (Ca_f) sans, puis avec 1, 5, 7.5 et 10 μM EGTA.

Fibre n° 081182.

B - Caractère gradué du mécanisme de "Ca-induced Ca-release" et détermination de l'activité calcique minimale pouvant induire une libération calcique à partir du RS.

La valeur de l'activité calcique minimale ou encore valeur seuil de Ca libre induisant un largage par le RS a été déterminée par l'expérience illustrée à la figure 44. Elle consiste à appliquer après charge calcique maximale du RS une solution Ca_f puis des solutions Ca_f contenant des concentrations croissantes d'EGTA (1, 5, 7.5, 10 μ M), le RS étant rechargé après chaque développement de tension. On observe que pour des concentrations croissantes d'EGTA, la latence de mise sous tension croît de 1 minute à 4 minutes 10 secondes et la vitesse de mise sous tension diminue.

Pour une concentration d'EGTA égale à 10 μ M aucune tension ne se développe. Il s'ensuit que la valeur seuil de Ca libre induisant une libération de calcium par le RS correspond à l'activité calcique d'une solution Ca_f comprenant entre 7.5 μ M d'EGTA et 10 μ M d'EGTA. Sachant que la constante d'association de l'EGTA pour le calcium, K_{CaEGTA} est égale à $1.919 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (ORENTLICHER et coll., 1977) et que la $[Ca]$ totale est comprise entre $1.25 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ et $1.6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ on peut conclure après calcul que la concentration en calcium libre déclenchant la libération calcique par le RS se situe entre $8.24 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ et $1.08 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

En outre, plus la concentration calcique extraréticulaire est élevée (de $8.24 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ à $1.25 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) plus la contraction est rapide et importante. Cela signifie que le largage calcique est plus rapide et plus important.

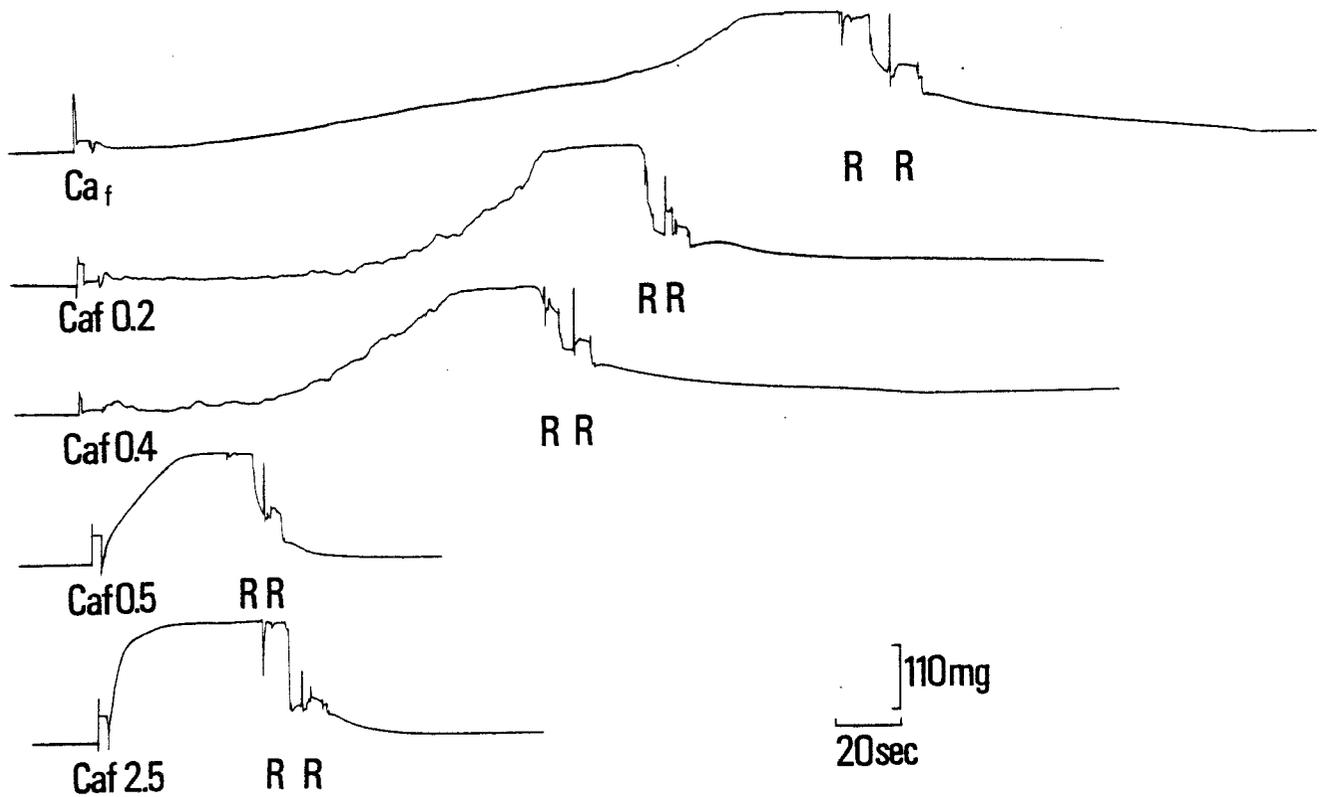


Figure 45 : Stimulation du mécanisme de "Ca-induced Ca release" par la caféine.

Enregistrements des contractions induites après charge calcique maximale du RS, par une solution de concentration calcique faible (Ca_f) sans, puis avec 0.2, 0.4, 0.5 et 2.5 mM caféine (Caf).

La fibre est relâchée par la solution relaxante, R.

Fibre n° 141282.

C - Stimulation du mécanisme de "Ca-induced Ca release" par la caféine.

La caféine est une drogue connue pour stimuler le mécanisme de calcium-induced calcium release. Afin de tester cet effet stimulant de la caféine sur le largage calcique, l'expérience illustrée à la figure 45 a été effectuée. Elle consiste à appliquer après une charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 min) une solution de concentration calcique faible seule ou à laquelle ont été ajoutées des concentrations variées de caféine (0.2, 0.4, 0.5 et 2.5 mM). Pour chaque solution testée, une tension dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous, se développe.

concentration caféinique (mM)	nombre de fibres (n)	amplitude de la con- traction (\bar{X} +/- SEM) (mg)	Latence + temps de mise sous tension maximale (\bar{X} +/- SEM) (sec)
0	5	187.55 +/- 10.96	250.09 +/- 17.58
0.2	11	175.62 +/- 11.54	177.09 +/- 32.77
0.4	4	197.31 +/- 0.49	131.00 +/- 4.24
0.5	6	160.19 +/- 9.83	31.00 +/- 6.28
2.5	4	163.63 +/- 26.25	21.00 +/- 13.43

Plus la concentration caféinique est élevée plus le développement de la contraction est rapide. Il n'y a cependant aucun effet significatif de la caféine sur l'amplitude de la contraction. Les modifications de cinétique sont résumées sur la courbe représentant le temps de mise sous tension maximale en fonction de la concentration caféinique (Fig. 46). On observe que

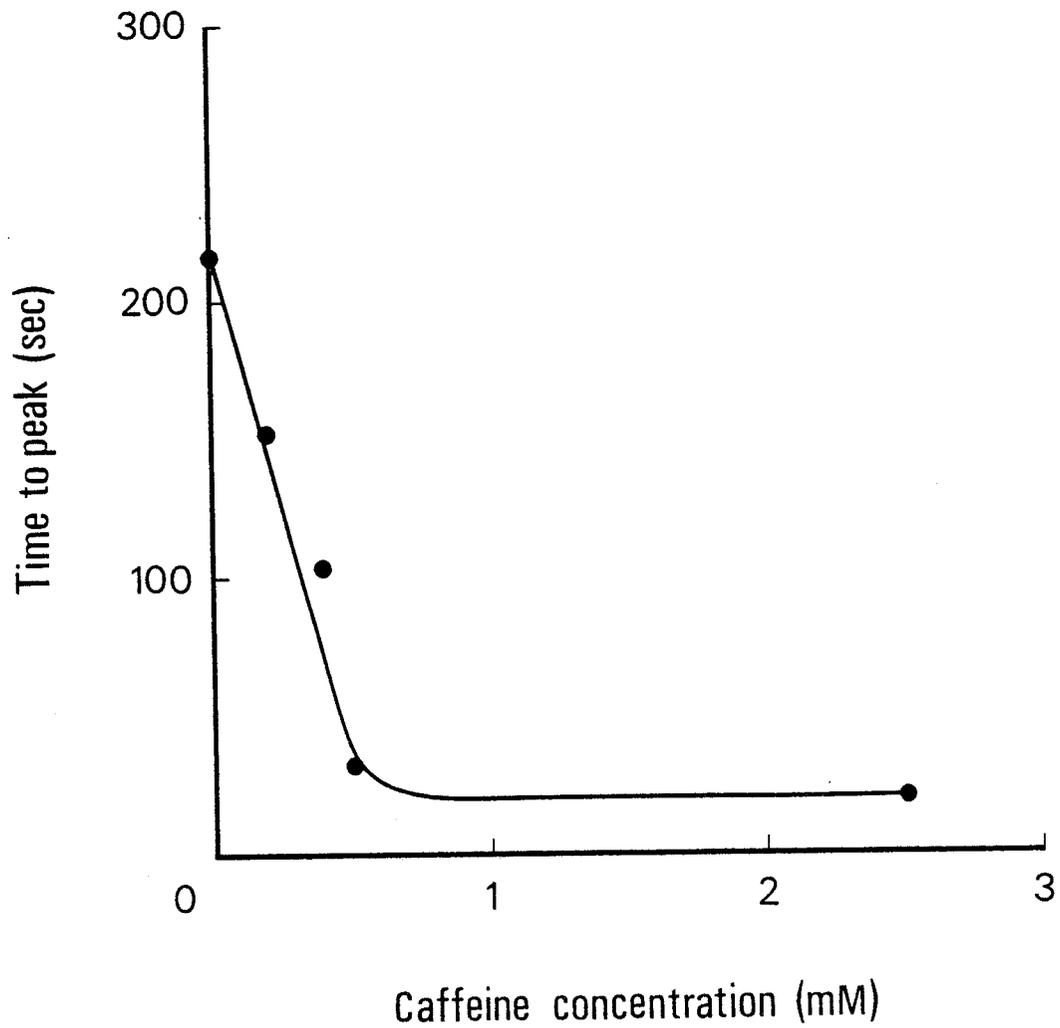


Figure 46 : Stimulation du mécanisme de "Ca-induced Ca release" par la caféine.

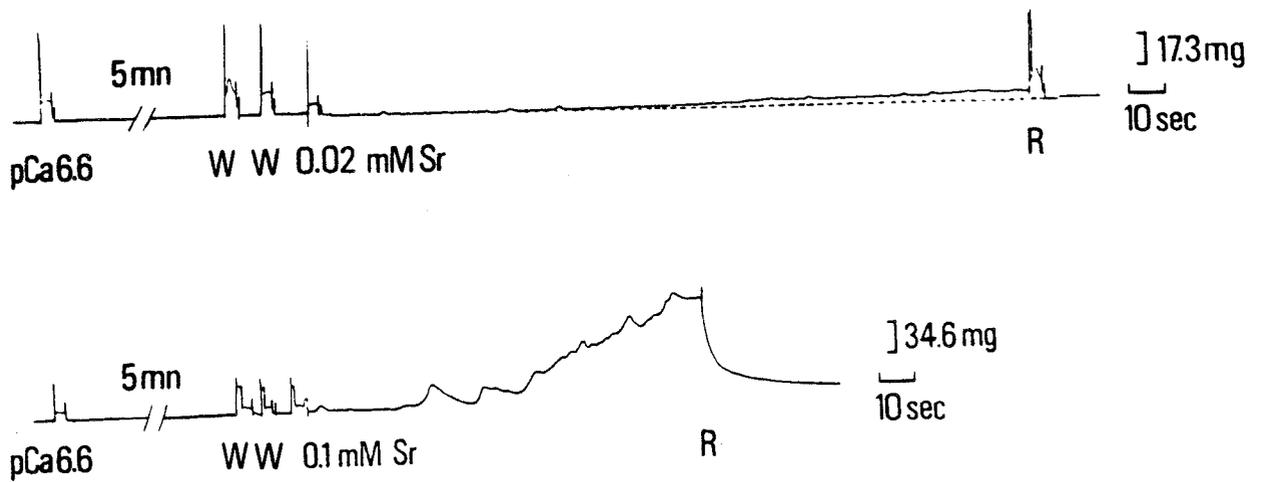
Relation entre le temps de mise sous tension maximale exprimé en sec. (ordonnée) et la concentration caféinique exprimée en mM (abscisse).

Même fibre qu'à la figure 45.

Le temps de mise sous tension maximale diminue de façon importante quand la concentration caféinique augmente de 0 à 0.5 mM et qu'ensuite la diminution est beaucoup plus faible lorsque la concentration caféinique passe de 0.5 à 2.5 mM.

En conclusion, plus la concentration caféinique est élevée plus le mécanisme de largage calcique est rapide. Cependant son amplitude ne semble pas être accrue.

Il est intéressant de comparer ici les résultats illustrés à la figure 31 et ceux reportés sur la figure 45. En effet, on observe que lorsque la caféine a été ajoutée non pas à une solution de concentration calcique faible mais à une solution de lavage (Fig. 31), les concentrations nécessaires pour obtenir la plus petite contraction décelable et la contraction maximale la plus rapide sont très nettement augmentées. En effet, 2.5 mM de caféine sont nécessaires pour observer une contraction lente et faible et 20 mM pour induire une contraction comparable à celle obtenue avec 2.5 mM caféine dans une solution de concentration calcique faible. La comparaison des contractions induites par 2.5 mM de caféine dans ces deux milieux est à ce titre indicatrice. En milieu de lavage l'amplitude de la contraction est égale à 20.8 % de la contraction caféinique maximale et son temps de mise sous tension maximale égal à 63 sec. En milieu calcique faible l'amplitude de la contraction caféinique est proche de 100 % de la contraction caféinique maximale et le temps de mise sous tension maximale égal à 20 sec. La présence d'une faible quantité de calcium dans la solution activatrice multiplie donc par 5 l'amplitude du largage induit par une même concentration de caféine.



Après traitement au brij

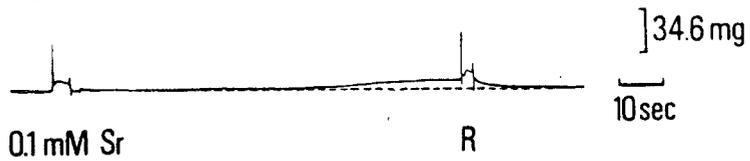


Figure 47 : Largage calcique induit par deux concentrations en ions Sr (0.02 et 0.1 mM) après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn).

En bas, effet d'une solution 0.1 mM Sr après traitement au brij.

W indique l'application de la solution de lavage.

R indique l'application de la solution relaxante.

Fibre n° 250383.

A la lumière de ce résultat on ne peut que penser aux résultats obtenus sur les fibres intactes et illustrés aux figures 29 et 30 montrant que la caféine seule induit un largage mais qu'en présence de calcium, elle induit un largage beaucoup plus important multipliant également par 5 l'amplitude de la contracture caféinique enregistrée.

II - ROLE DU STRONTIUM

Afin de renforcer le résultat selon lequel un cation divalent, le calcium, induit un largage calcique à partir du RS, nous avons testé les effets d'un autre cation divalent : le strontium (Sr).

A - Largage calcique induit par les ions strontium

L'expérience permettant de déterminer si les ions Sr induisent un largage calcique à partir du RS est illustrée à la figure 47. Après avoir chargé le RS en calcium (pCa 6.6) pendant 5 minutes, puis lavé 2 fois la fibre, une solution de concentration en ions strontium (Sr) égale à 0.02 mM est appliquée. Une tension lente se développe sur laquelle se greffent des pics de tension de cinétique rapide. Cette tension complexe peut être séparée en deux composantes : i) une composante lente d'amplitude égale à 7.78 mg maintenue jusqu'à ce que la solution relaxante soit appliquée, son temps de sous mise sous maximale est égal à 6 min 3 sec. ii) des pics phasiques de tension de cinétique rapide se développant au hasard sur la première composante. Leurs amplitudes varient entre 1 et 3.5 mg.

Ces deux composantes ont une amplitude accrue lorsqu'une concentration supérieure en strontium est appliquée (0.1 mM, Fig. 47). La composante lente atteint une amplitude égale à 138.4 mg et l'amplitude des pics de tension varie entre 5 mg et 30 mg. Le développement de la composante lente est accéléré puisqu'elle atteint son maximum en 3 min 9 sec. Notons ici que l'amplitude des deux composantes de tension varie d'une fibre à l'autre. Les valeurs moyennes obtenues sur 6 fibres donnent une amplitude de la composante lente égale à 106.99 ± 35.32 mg ($\bar{x} \pm$ SEM) et une amplitude des pics de tension variant entre 1.51 et 57.53 mg ; la moyenne est égale à 18.57 ± 4.82 mg ($\bar{x} \pm$ SEM).

Afin de déterminer si la tension complexe décrite ci-dessus est due soit à un largage calcique par le RS soit à une activation directe des protéines contractiles par les ions Sr, la fibre a, à nouveau, été baignée par une solution contenant 0.1 mM Sr après avoir effectué un traitement au brij (2 %, 1 heure). Les résultats montrent (Fig. 47) la disparition des pics phasiques de tension et une réduction très importante de la composante lente. Elle est sur cette fibre égale à 8.75 % (12.11 mg) de la composante lente observée avant le traitement au brij.

Il apparaît donc qu'une faible part de la contraction est due à l'activation directe des protéines contractiles par les ions Sr. La majorité (90 %) de l'amplitude de la composante lente de tension et les pics phasiques de tension sont dus au largage calcique induit par les ions strontium. De plus, l'amplitude du largage induit par un mécanisme de "strontium induced calcium release" est dépendant de la concentration en ions strontium. Plus cette concentration est élevée plus le largage est important.

Les ions Sr comme les ions Ca peuvent induire un largage calcique. La différence réside dans le fait que la concentration minimale de strontium libre nécessaire pour induire une libération calcique est de l'ordre de 1000 fois plus élevée que la concentration minimale de calcium libre nécessaire pour induire le largage.

Les faits connus selon lesquels le strontium peut se substituer aux ions calcium dans les divers mouvements calciques conduisant à la contraction mais avec une efficacité moindre, associés à l'existence démontrée dans ce travail d'un mécanisme de "Sr-induced Ca release" viennent renforcer l'existence d'un mécanisme de "Ca-induced Ca release" étudié dans ce travail.

Il nous faut cependant nous assurer que les ions Sr peuvent sur les fibres musculaires de crabe se substituer aux ions Ca dans les différents mécanismes conduisant au développement de la contraction c'est-à-dire le largage calcique par le réticulum sarcoplasmique, la capture du calcium par l'ATPase calcique du RS et la fixation des ions calcium sur les sites calciques de la troponine C.

B • Pompage et libération du strontium par le RS

Afin de déterminer si les ions Sr sont pompés par l'ATPase calcique du RS et/ou largués par le RS, l'expérience suivante a été effectuée (Fig. 48). La quantité de calcium ou de strontium larguée a été évaluée à l'aide de l'indicateur métallochromique bien connu : l'arsenazo III et non par l'amplitude de la contraction développée car nous verrons plus loin (voir Fig. 49) que les ions Sr ont une moins grande efficacité que les ions Ca dans l'activation directe des protéines contractiles.

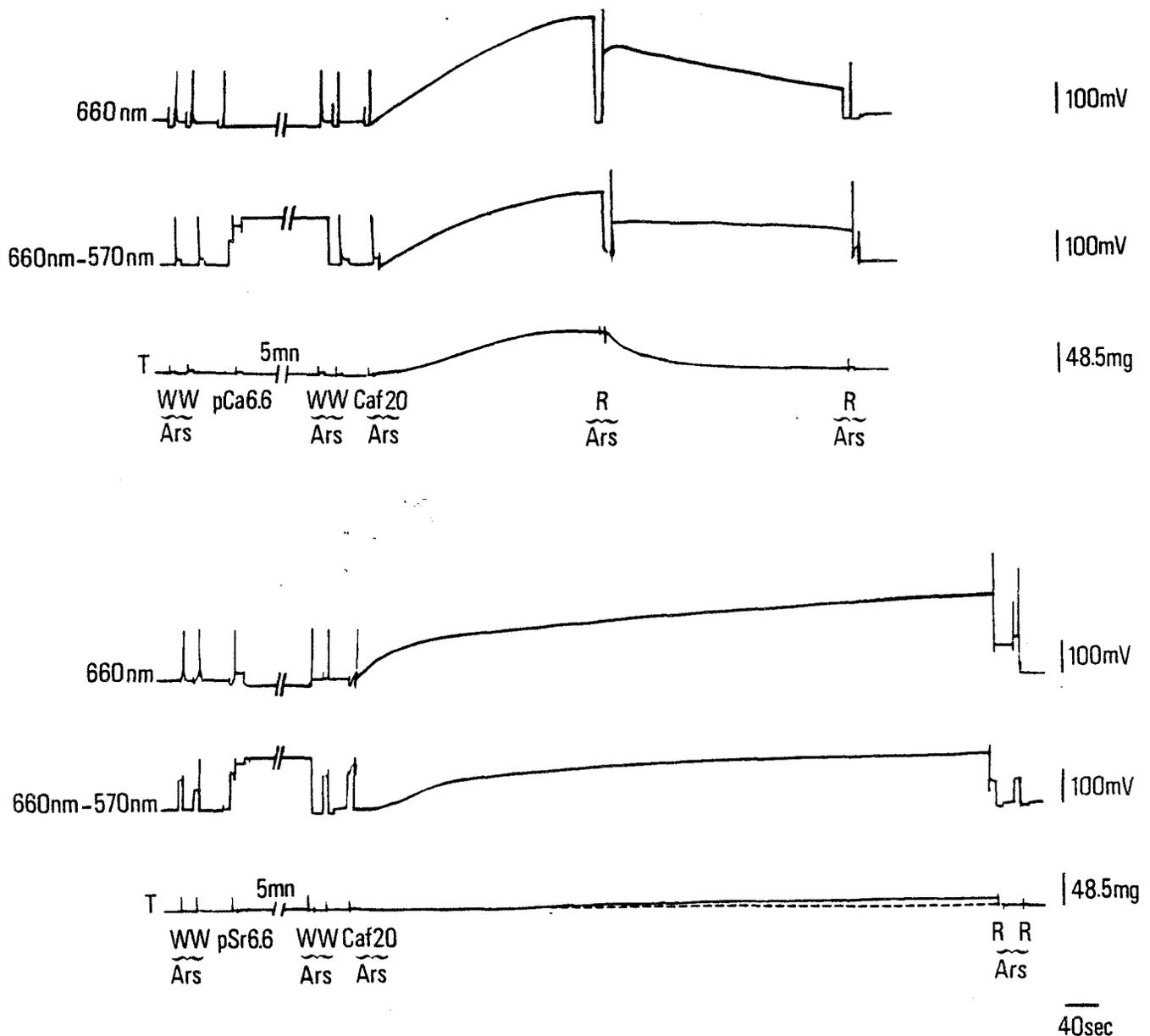


Figure 48 : Contrôle de la perméabilité du RS aux ions Sr à l'aide de l'arsenazo.

Tracés des variations d'absorptions lumineuses de l'arsenazo à 660 nm et 660 nm - 570 nm et de la contraction (T) induites par une solution caféinique 20 mM (Caf 20).

En haut : après charge calcique du RS (pCa 6.6, 5 mn).

En bas : après charge en strontium du RS (pSr 6.6, 5 mn).

W indique l'application de la solution de lavage.

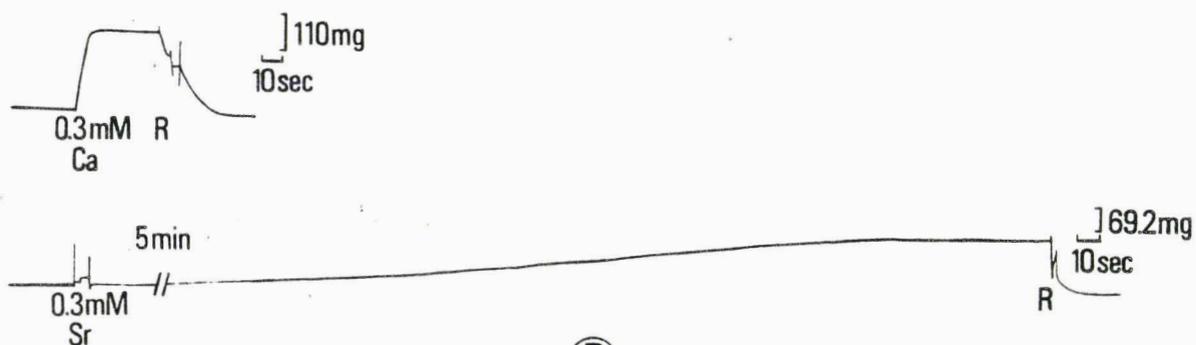
R indique l'application de la solution relaxante.

La présence d'arsenazo dans les solutions est précisée par une accolade horizontale au-dessous de laquelle est indiqué Ars.

Fibre n° 260583.

Le RS est tout d'abord chargé de façon maximale durant 5 minutes à l'aide d'une solution pCa 6.6 ne contenant pas d'arsenazo III afin de ne pas chélater le calcium présent dans cette solution. Ensuite la fibre est lavée deux fois avec une solution W contenant 0.1 mM d'arsenazo. Finalement la solution caféinique contenant 0.1 mM d'arsenazo est appliquée. Les enregistrements obtenus à 660 nm et au niveau du signal différentiel 660 nm - 570 nm révèlent une augmentation de l'absorption lumineuse. Parallèlement une tension d'amplitude égale à 90.40 mg se développe lentement. Le temps de mise sous tension maximale est égale à 15 secondes. La solution relaxante contenant 0.1 mM arsenazo est ensuite appliquée. On observe une diminution de l'absorption lumineuse jusqu'au niveau de base ainsi que le relâchement de la fibre. L'application de la solution caféinique contenant de l'arsenazo a ensuite été appliquée plusieurs fois sans charge préalable du RS. Durant ces bains répétés en caféine (20 mM) l'absorption lumineuse décroît ainsi que l'activité mécanique jusqu'à l'annulation des 3 signaux enregistrés. Lorsque nous sommes assurés qu'il n'y a plus de calcium disponible pour le largage calcique, le RS est chargé par une solution de concentration en strontium pSr égale à 6.6 pendant 5 minutes. Le largage est ensuite induit par la caféine. On observe une augmentation de l'absorption lumineuse au niveau du signal 660 nm et 660 nm - 570 nm ainsi que le développement d'une contraction ayant les caractéristiques suivantes : amplitude, 7.61 mg ; temps de mise sous tension maximale, 608 sec. Ceci est donc une indication que les ions Sr ont été captés par l'ATPase calcique du RS. La détermination de la quantité de calcium largué lors de la première application de caféine et de strontium largué après la charge en strontium du RS a été effectuée à l'aide des courbes étalons illustrées à la figure 21. La moyenne déterminée à partir des résultats obtenus sur 5 fibres donnent les valeurs suivantes :

(A)



(B)

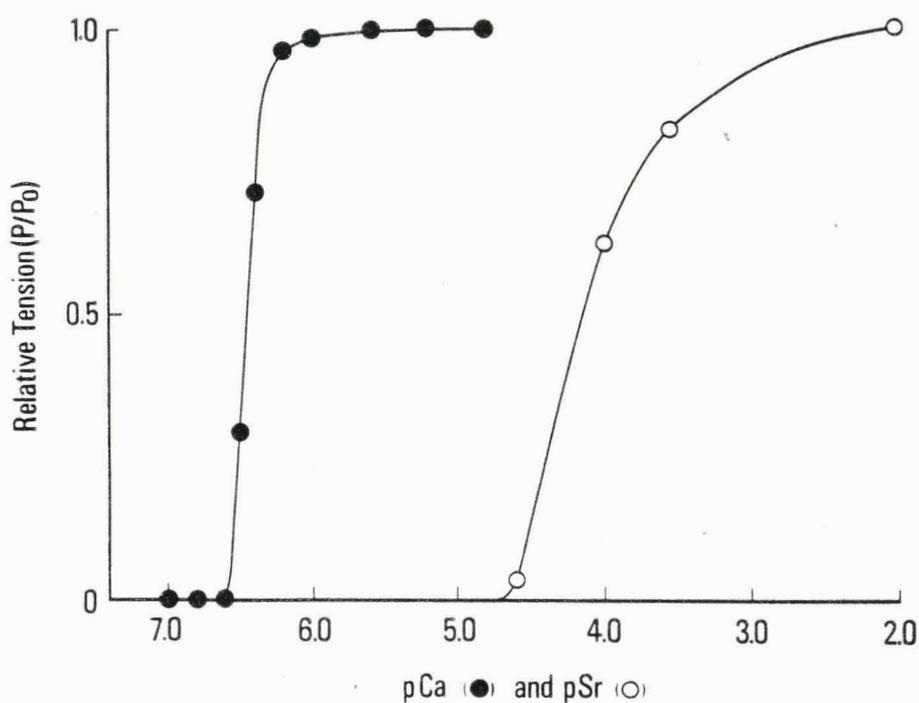


Figure 49 : Comparaison de l'effet des ions Ca et Sr sur les protéines contractiles.

A : contractions induites par 0.3 mM Ca et 0.3 mM Sr. Notez la différence de sensibilité de l'amplitude.

B : relation entre l'amplitude de la contraction (T) exprimée par rapport à l'amplitude de la contraction maximale (T_{max}) en fonction de pCa (●) et pSr (○).

Fibre n° 250383.

270 +/- 13.21 μM (mean +/- SEM) de calcium largué et 103.7 +/- 6.32 μM (mean +/- SEM) de strontium libéré. La quantité de strontium libérée est donc égale à 34.4 % de la quantité de calcium larguée. Cette diminution importante du largage strontium peut être due soit à une perméabilité inférieure de la membrane du RS soit à une capture plus faible des ions Sr par l'ATPase calcique.

C - Fixation des ions Sr^{++} sur les protéines contractiles

L'activité maximale des protéines contractiles en milieu calcium (P_0^{Ca}) induite par 0.3 mM CaCl_2 est comparée à l'activité mécanique obtenue par l'application de 0.3 mM SrCl_2 (Fig. 49 A). Sur la fibre illustrée à la figure 49, P_0^{Ca} atteint une amplitude de 236.5 mg en 10 sec et l'activité mécanique induite par 0.3 mM Sr atteint une amplitude de 155.8 mg en 11 minutes. En milieu Sr^{++} , la tension obtenue est donc égale à 66 % de P_0^{Ca} . Les moyennes obtenues sont pour ces deux types de tension respectivement égales à 219.86 +/- 16.60 mg (\bar{x} +/- SEM, 8 fibres) et 159.0 +/- 13.5 mg (\bar{x} +/- SEM, 5 fibres). Les ions Sr^{++} peuvent donc se substituer aux ions Ca^{++} sur les sites de la troponine et activer l'actomyosine ATPase. Cependant, ces protéines semblent présenter une sensibilité plus faible pour le strontium que pour le calcium. De plus la cinétique de développement de la contraction est très nettement ralentie.

Afin de déterminer si les sites calciques de la troponine ont une affinité plus faible pour les ions strontium et/ou la quantité maximale d'ions strontium fixés est différente de celle des ions calcium, les relations liant d'une part l'amplitude de la contraction en fonction de pCa et

d'autre part l'amplitude des contractions induites par des pSr variées ont été établies (Fig. 49 B). En présence d'ions Ca le seuil de développement de la contraction se situe pour une pCa égale à 6.6. En outre, plus la pCa est faible, c'est-à-dire plus la concentration d'ions Ca augmente, plus l'amplitude de contraction augmente pour atteindre un maximum voisin de 190 mg. En présence d'ions Sr (pSr) le seuil de développement de l'activité mécanique est déplacé vers des valeurs plus faibles de pSr : le seuil est égal à pSr 4.6. Plus la concentration en ions Sr est élevée plus la contraction est de grande amplitude pour atteindre un maximum (P_0^{Sr}) égal à 193 mg pour pSr 2.0. Les valeurs de pCa et pSr pour lesquelles les contractions sont respectivement égales à 50 % P_0^{Ca} et 50 % P_0^{Sr} sont une indication de l'affinité des protéines contractiles pour ces deux cations divalents. En effet, comme nous l'avons déjà indiqué, plus cette valeur de pCa ou pSr est élevée plus l'affinité est élevée. A partir de cette expérience, on peut donc conclure que l'affinité des protéines contractiles pour Sr^{++} est plus faible que leur affinité pour Ca^{++} . De plus, P_0^{Sr} a une amplitude voisine de P_0^{Ca} . Il s'ensuit donc que les quantités maximales d'ions Ca et Sr fixés sur la troponine sont égales mais que l'apport d'ions Sr doit être plus important que l'apport d'ions Ca pour obtenir cette fixation maximale. Enfin, la détermination du coefficient de Hill donne une valeur de 1.59 avec un coefficient de corrélation de 0.96. Cette faible valeur du coefficient de Hill comparée à celle obtenue lors de l'activation calcique des protéines contractiles (4.50) laisse supposer que le nombre de sites calciques impliqués dans le développement de l'activité mécanique due aux ions Sr^{++} ou que leur coopérativité sont très nettement diminués.

D - Conclusion

En conclusion, les ions Sr peuvent se fixer sur les protéines contractiles, induire un largage calcique et être pompés et libérés par le RS. Ils se substituent donc aux ions Ca dans ces quatre mécanismes mais avec une efficacité moins grande que les ions calcium. Le développement d'une contraction en présence de 0.1 mM Sr due essentiellement à un mécanisme de "Sr-induced Ca release" est un résultat en faveur de l'existence d'un mécanisme de "Ca-induced Ca release" sur les fibres musculaires de Crabe. La différence réside dans le fait que la concentration minimale de strontium libre nécessaire pour induire une libération calcique est de l'ordre de 1000 fois plus élevée que la concentration minimale de calcium libre nécessaire pour induire le largage. On devrait de façon plus générale parler d'un "divalent-cation induced Ca release".

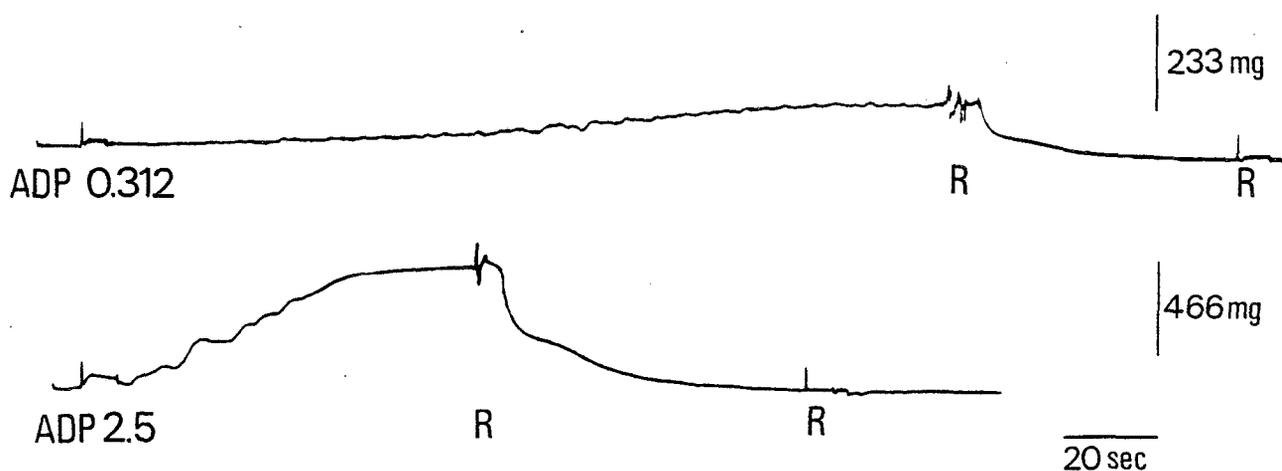


Figure 50 : Relation effet-dose en ADP.

Enregistrements des contractions induites par 0.312 mM et 2.5 mM d'ADP après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn, non indiqué sur la figure). La fibre est relâchée par la solution relaxante, R.

Notez la différence de sensibilité de l'enregistrement.

Fibre n° 270485.

ROLE DE L'ADP DANS LE MECANISME DE LIBERATION CALCIQUE ET MISE EN EVIDENCE D'UN EFFET SPECIFIQUE SUR LE RS

L'étude porte sur la capacité de l'Adénosine-Di-Phosphate (ADP) à induire un largage calcique à partir du RS. L'amplitude du largage calcique est évaluée par l'amplitude de la tension qui se développe. Deux types d'expériences ont été effectués afin d'établir la dépendance du largage calcique vis à vis d'une part de la concentration en ADP de la solution et d'autre part de l'amplitude de la charge calcique. De plus, des contrôles expérimentaux ont été effectués afin de s'assurer que les contractions observées en présence d'ADP sont bien dues à un largage calcique à partir du RS et non au développement d'une tension dite de "rigor" due à un excès d'ADP au niveau des protéines contractiles.

I - LIBERATION CALCIQUE INDUITE PAR L'ADP

A - Relation effet-dose en ADP

Le protocole expérimental est le suivant : le RS est chargé de façon maximale en calcium (pCa 6.6, 5 minutes). Après un double lavage, des solutions physiologiques de concentrations variées en ADP (0.312, 0.625, 1.25, 2.5 et 5 mM) sont appliquées. Dans ces solutions, la concentration habituelle en Mg ATP est maintenue afin de permettre le développement de la force contractile, le Mg ATP étant en effet connu comme substrat de l'hydrolyse de l'ATPase de la myosine (voir HISTORIQUE).

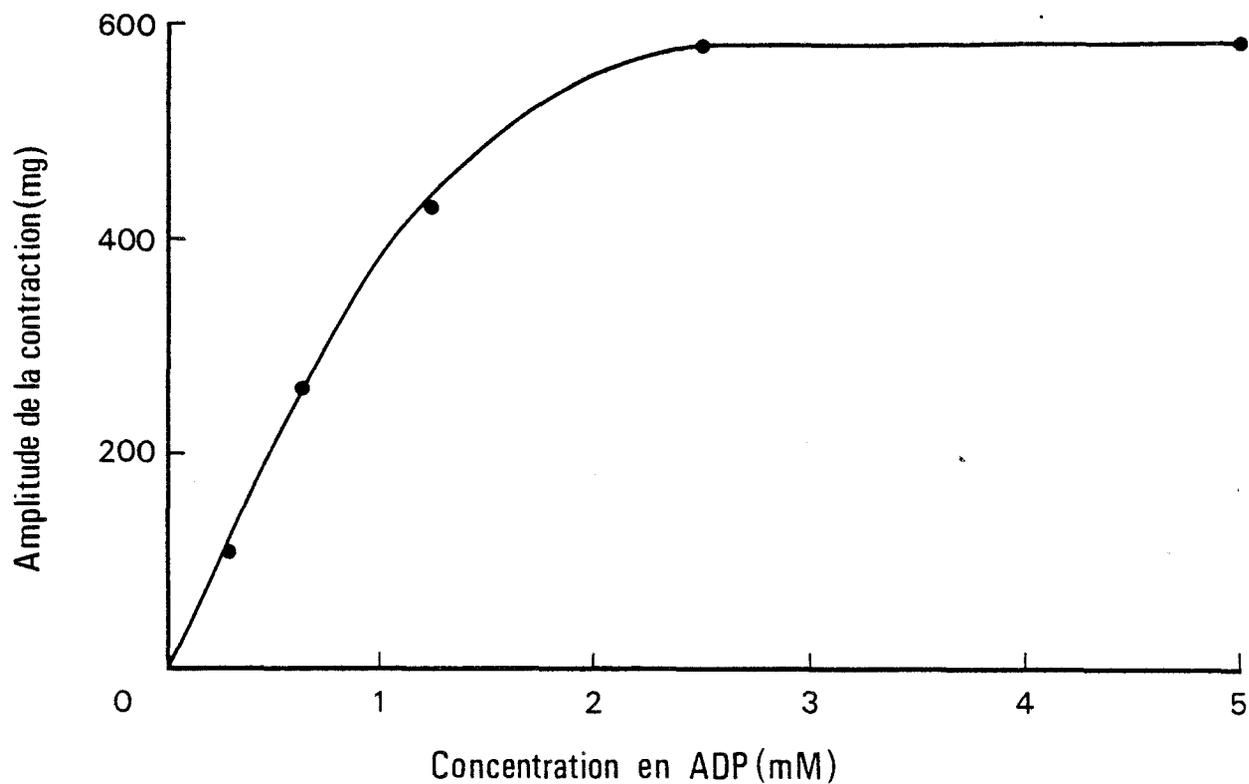


Figure 51 : Relation effet-dose en ADP.

Courbe exprimant la dépendance de l'amplitude de la contraction (ordonnée) vis à vis de la concentration en ADP exprimée en mM (abscisse).

Même fibre qu'à la figure 50.

Les enregistrements des contractions obtenues sur une même fibre pour une concentration de 0.312 mM et 2.5 mM d'ADP sont illustrés à la figure 50. Pour une concentration de 0.312 mM après une latence de 11 sec une tension se développe lentement atteignant un plateau de 110.68 mg après 144 sec. La contraction se relâche lors de l'application de la solution relaxante. Pour 2.5 mM ADP une contraction plus rapide et plus ample se développe sans latence. Son amplitude est égale à 576.68 mg et le temps de mise sous tension maximale à 58 sec.

L'ensemble des résultats obtenus sur cette même fibre sont résumés sur la courbe reliant l'amplitude de la contraction à la concentration en ADP (Fig. 51). Plus la concentration en ADP est importante plus l'amplitude de la contraction est élevée. Elle atteint un maximum pour une concentration égale à 2.5 mM. Des résultats comparables ont été obtenus sur 3 autres fibres.

B - Relation entre le largage induit par l'ADP et le temps de charge du RS

Le réticulum sarcoplasmique est chargé en calcium (pCa 6.6) pendant des durées variables (30 sec, 1,2, 3 et 5 minutes). Pour chaque temps de charge une solution contenant 2.5 mM ADP est appliquée. Cette concentration a été choisie car elle permet le développement d'une contraction maximale pour 5 minutes de charge du RS (voir Fig. 51).

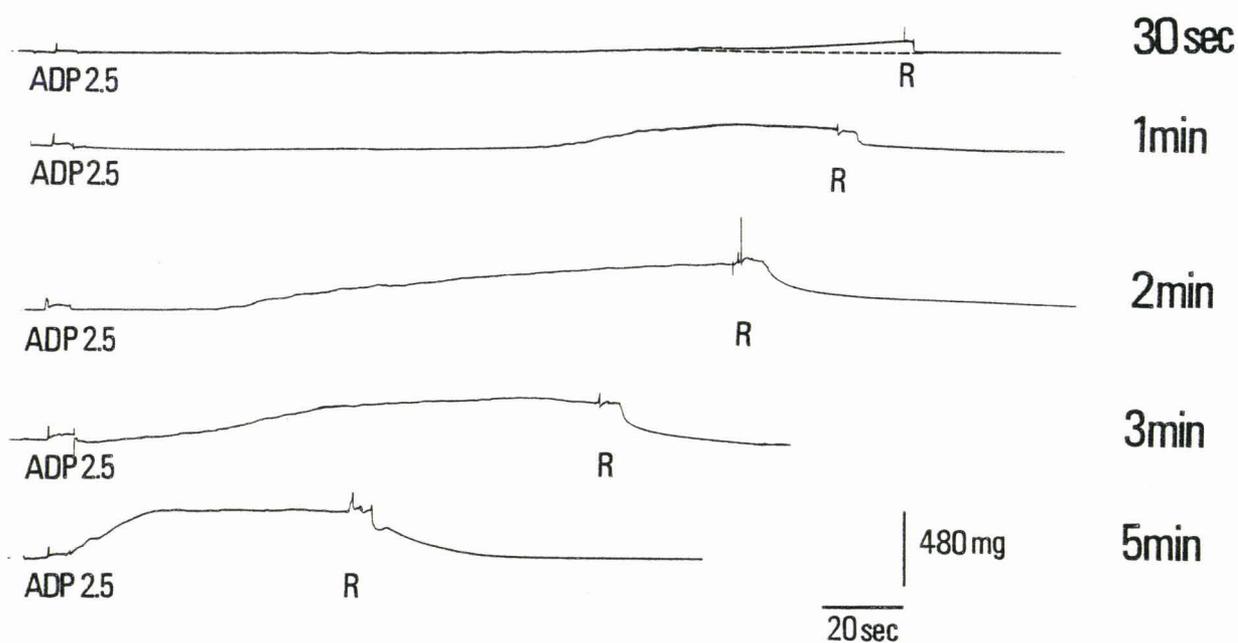


Figure 52 : Influence de la variation du temps de charge.

Enregistrements des contractions induites par une solution contenant 2.5 mM ADP (ADP 2.5) pour des temps de charge variés du réticulum sarcoplasmique à l'aide de la solution pCa 6.6. Les temps de charge sont indiqués à droite des enregistrements.

Fibre n° 181084.

Les enregistrements illustrés à la figure 52 montrent que plus le temps de charge est long, plus l'amplitude de la contraction est élevée et plus le développement de la tension est rapide. Les amplitudes sont respectivement égales à 67.5, 138, 264, 312 et 324 mg. Les contractions induites après 30 sec, 1 min, 2 min et 3 min de charge présentent une latence d'une durée respectivement égale à 125, 93, 37 et 8 sec. Les temps de mise sous tension maximale (latence incluse) sont 209, 167, 153, 107 et 23 sec.

L'ensemble des résultats est résumé sur la courbe liant la durée du temps de charge calcique du RS à l'amplitude de la contraction (fig. 53). Plus le temps de charge est élevé plus la contraction est ample. Elle atteint un maximum pour un temps de charge proche de 3 min. Des résultats comparables ont été obtenus sur 5 autres fibres.

En conclusion, l'ADP induit, même à faible dose, un largage calcique à partir du RS et un largage calcique induit par 2.5 mM ADP peut même avoir lieu lorsque le RS est faiblement chargé.

II - CONTROLES EXPERIMENTAUX

Afin de s'assurer que les contractions observées en présence d'ADP sont bien dues au largage calcique à partir du RS et non au développement d'une tension dite de "rigor" due à un excès d'ADP au niveau des protéines contractiles, deux séries d'expériences ont été effectuées. La première consiste à traiter la fibre musculaire au brij 2 % pendant 1 heure

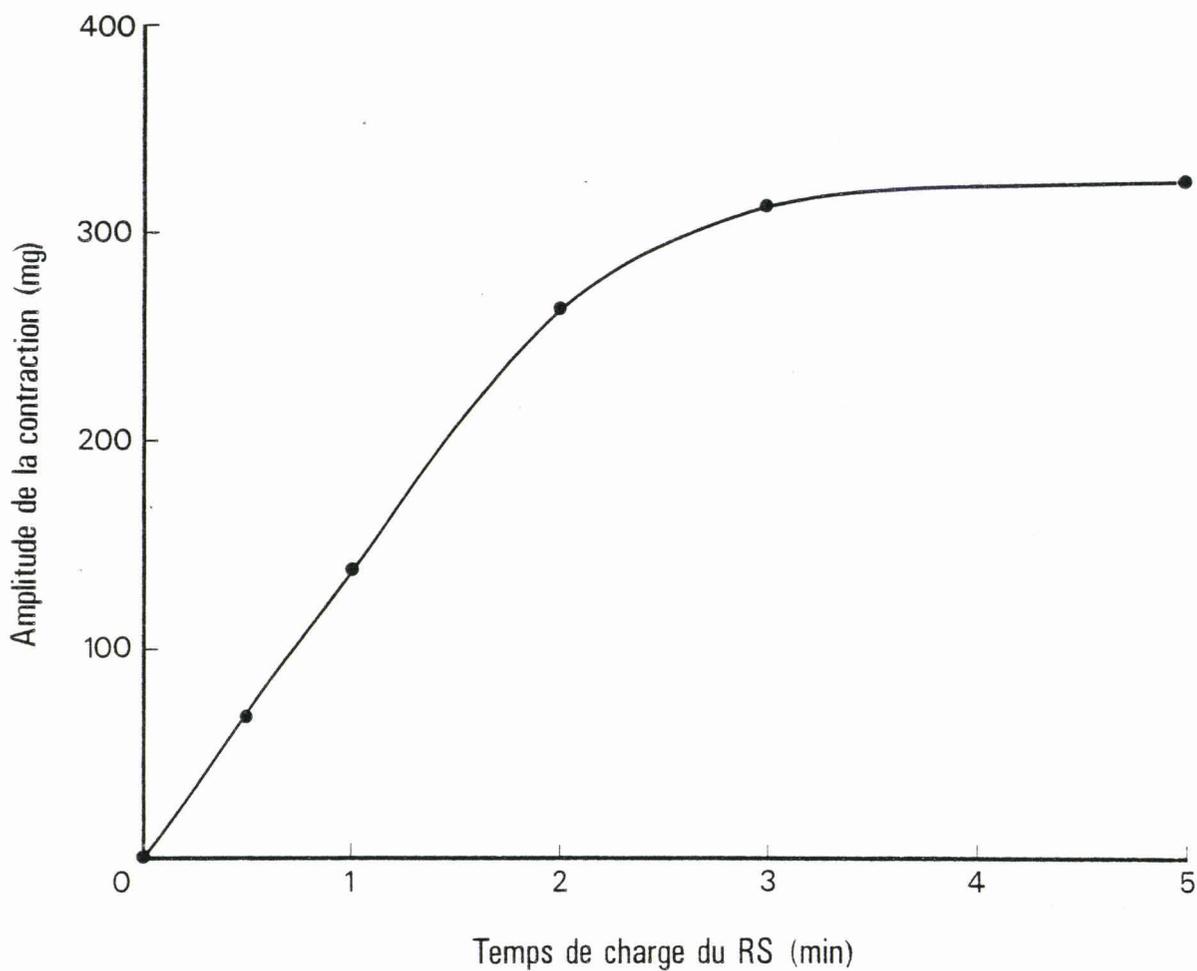


Figure 53 : Influence de la variation du temps de charge.

Courbe traduisant l'évolution de l'amplitude de la contraction induite par 2.5 mM ADP (ordonnée) en fonction du temps de charge (abscisse).

Même fibre qu'à la figure 52.

pour détruire le RS et à appliquer ensuite une solution contenant de l'ADP. La seconde consiste à appliquer sur des fibres musculaires ayant un RS intact, une solution contenant outre le Mg ATP et l'ADP, un régénérateur d'ATP : l'arginine phosphate. La régénération de l'ATP s'effectue selon la réaction biochimique suivante :



avec $\text{Arg} \sim \text{P}$ = arginine phosphate et Arg = arginine.

A - Comparaison des effets de l'ADP sur un fibre ayant un RS intact puis détruit.

Cette expérience consiste à comparer la réponse de la fibre musculaire après une charge calcique maximale (pCa 6.6, 5 min) lors de l'application d'une concentration d'ADP permettant le développement d'une contraction maximale (2.5 mM) ceci avant et après traitement au brij 2 % pendant une heure. Nous savons que ce traitement est suffisant pour annuler tout largage calcique du RS (voir Fig. 36). L'expérience illustrée à la figure 54 montre le développement, avant la destruction du RS, d'une contraction atteignant une amplitude maintenue de 605.8 mg en 76 sec après une latence de 5 sec. La fibre se relâche lors de l'application de la solution relaxante. Une fois le RS détruit, une même concentration d'ADP induit après une latence importante (57.5 sec), le développement d'une tension faible (61.16 mg) et légèrement plus rapide (temps de mise sous tension maximale égale à 66 sec). Notons de plus que les légères oscillations toujours visibles sur l'ensemble de nos tracés avant la destruction du RS ont totalement disparu après le traitement au brij.

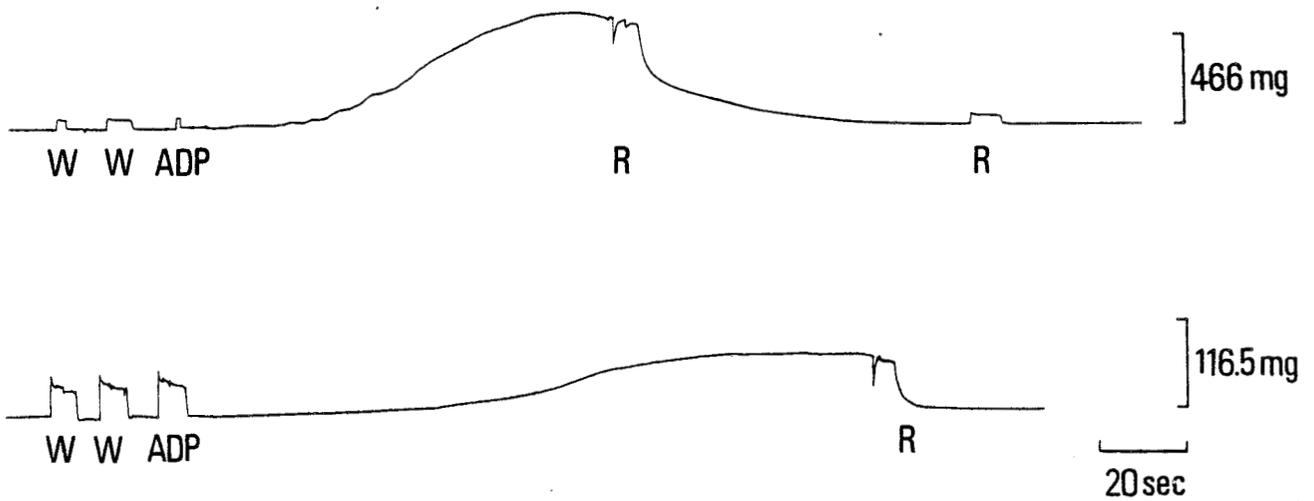


Figure 54 : Contrôle d'un effet spécifique de l'ADP sur le réticulum sarcoplasmique.

En haut : avant traitement au brij, contraction induite par 2.5 mM ADP après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn, non indiqué sur le tracé).

En bas : après traitement au brij, existence d'une contraction de faible amplitude après application d'une solution contenant 2.5 mM ADP.

Notez la sensibilité plus importante de l'enregistrement situé en bas.

Fibre n° 110185.

Il s'ensuit donc que 90 % de la contraction observée avant traitement brij sont le résultat d'une activation calcique et donc d'un largage calcique alors que 10 % sont la conséquence d'une tension de rigor par excès d'ADP.

B - Largage calcique induit par l'ADP en présence d'arginine phosphate (Fig. 55)

Après charge calcique maximale du RS une solution contenant 2.5 mM ADP et 10 mM d'arginine phosphate induit le développement sans latence d'une contraction d'amplitude égale à 454.35 mg et un temps de mise sous tension maximale de 42 sec. Des oscillations sont présentes. Lorsque le plateau de contraction est atteint, l'application de la solution R induit son relâchement. Le RS est ensuite une nouvelle fois chargé en calcium (pCa 6.6, 5 min) et une solution contenant 2.5 mM ADP mais pas d'arginine phosphate est amenée dans la cuve expérimentale. Une contraction plus lente (temps de mise sous tension maximale, 209 sec) et d'amplitude comparable à la précédente mais cependant plus faible, se développe. L'amplitude est égale à 419.4 mg soit 92 % de la précédente. Des oscillations existent.

Cependant, avant de conclure que la contraction observée en présence d'arginine phosphate n'est effectivement pas due à un excès d'ADP, des expériences ont été effectuées afin de s'assurer de l'existence sur les myofibrilles des fibres mécaniquement pelées de crabe, de l'enzyme permettant le déroulement de la réaction 1) : l'arginine kinase.

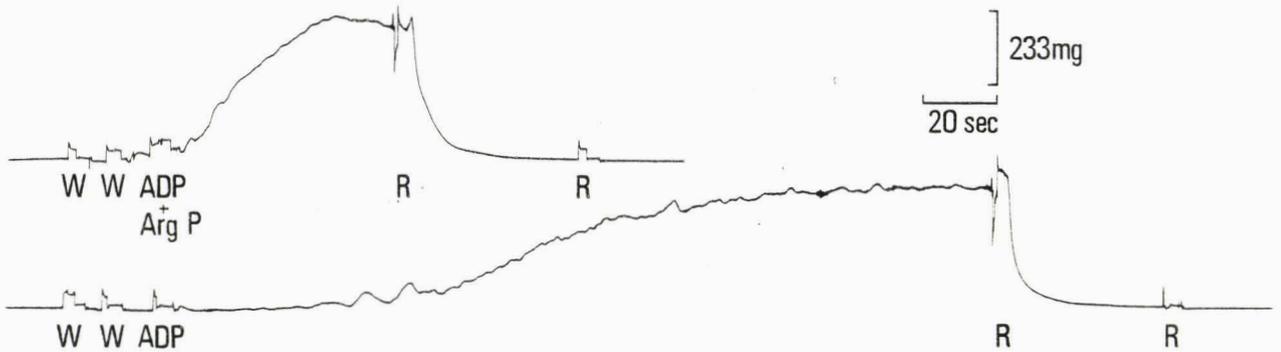


Figure 55 : Contrôle d'un effet spécifique de l'ADP sur le réticulum sarco-plasmique.

En haut : enregistrement d'une contraction induite par une solution contenant outre 2.5 mM ADP, 10 mM d'arginine phosphate (ADP + Arg P) après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn, non indiqué sur la figure).

En bas : enregistrement d'une contraction induite par une solution contenant uniquement 2.5 mM ADP, après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 mn, non indiqué sur la figure).

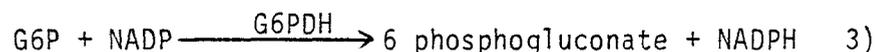
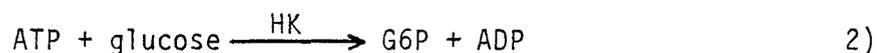
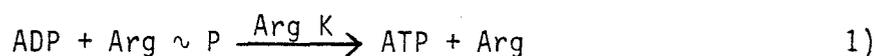
W indique l'application de la solution de lavage.

R indique l'application de la solution relaxante.

Fibre n° 290185.

Ces expériences ont pu être menées au laboratoire de physiologie cellulaire cardiaque, Unité INSERM 241 (ORSAY-France) grâce aux compétences scientifiques du Dr R. VENTURA-CLAPIER.

La mesure de l'activité enzymatique de l'arginine kinase est basée sur la mesure de la fluorescence du NADPH (Nicotineamide de nucléotide phosphate réduit). En effet cette molécule excitée par une longueur d'onde égale à 340 nm émet une fluorescence à 460 nm. La séquence de réactions biochimiques conduisant à la production du NADPH est la suivante :



avec ADP = adénosine diphosphate ; Arg ~ P = arginine phosphate ; Arg K = arginine kinase ; ATP = adénosine triphosphate ; HK = hexokinase ; G6P : glucose 6 phosphate ; NADP = nicotine amide de nucléotide phosphate ; G6PDH = glucose 6 phosphate deshydrogénase ; NADPH = nicotineamide de nucléotide phosphate réduit.

Les concentrations des différents substrats en enzymes ont été choisies de façon telle que les réactions 2) et 3) ne soient pas limitantes c'est-à-dire qu'elles soient rapides par rapport à la réaction 1). Les résultats obtenus montrent qu'il existe une activité arginine kinase sur les myofibrilles des fibres mécaniquement pelées de crabe. Cette activité exprimée par mg de protéines est égale à 320.06 +/- 34.10 nmoles/min/mg

($\bar{x} \pm$ SEM, $n = 2$) à 17°C. Donc, l'enzyme permettant la transformation d'un excès d'ADP en ATP lorsque l'arginine phosphate existe dans le milieu, est présente au sein des fibres musculaires testées. Il s'en suit que la contraction observée en présence d'arginine phosphate n'est pas une contraction de rigor due à un excès d'ADP.

En conclusion, l'arginine phosphate ne modifie pas l'amplitude du largage calcique à partir du RS. Celui-ci est donc bien une conséquence de l'action de l'ADP sur le RS. Par contre, la cinétique de développement de la contraction est nettement accélérée. Cette accélération peut être due soit à une augmentation de la vitesse de largage soit à une augmentation de la vitesse de formation des ponts entre l'actine et la myosine et/ou une diminution de la vitesse de détachement de ces mêmes ponts (voir HISTORIQUE). Ce fait sera abordé et discuté dans le chapitre "DISCUSSION".

III - CONCLUSION

Bien qu'une faible fraction (10 %) de la contraction obtenue ne soit pas due à une activation calcique des protéines contractiles par le calcium largué mais à un état de rigor dû à l'excès d'ADP, l'Adénosine-Di-Phosphate a un effet propre sur le réticulum sarcoplasmique tel qu'elle induit un largage calcique d'autant plus important que la dose d'ADP est élevée et que la charge calcique intraréticulaire est importante.

Le mécanisme de libération calcique fait donc peut-être intervenir l'ATPase calcique du RS.

EFFETS DES INHIBITEURS POTASSIQUES SUR LES PROTEINES CONTRACTILES ET LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE.

Dans le cadre de l'étude du couplage excitation-contraction effectuée par l'enregistrement simultané des courants ioniques membranaires et de la contraction, deux inhibiteurs des flux potassiques sont classiquement utilisés afin d'enregistrer un courant calcique non antagonisé par les courants potassiques et d'établir la relation entre le courant entrant I_{Ca} et l'activité mécanique (voir Fig. 25). Les deux inhibiteurs potassiques les plus couramment utilisés sont : le chlorure de tétraéthylammonium (TEA) et la 4-aminopyridine (4 AP).

I - LE TETRAETHYLAMMONIUM *

A - Courants ioniques membranaires et activité mécanique en présence de tétraéthylammonium.

L'enregistrement simultané des courants ioniques membranaires I et de l'activité mécanique (T) obtenu à l'aide de la technique du double pont

** Une partie de cette étude a été effectuée en collaboration avec Laurence LECONTE dans le cadre de la préparation de son DEA (LECONTE, 1985). Les paragraphes concernés seront indiqués d'un astérisque (*).*

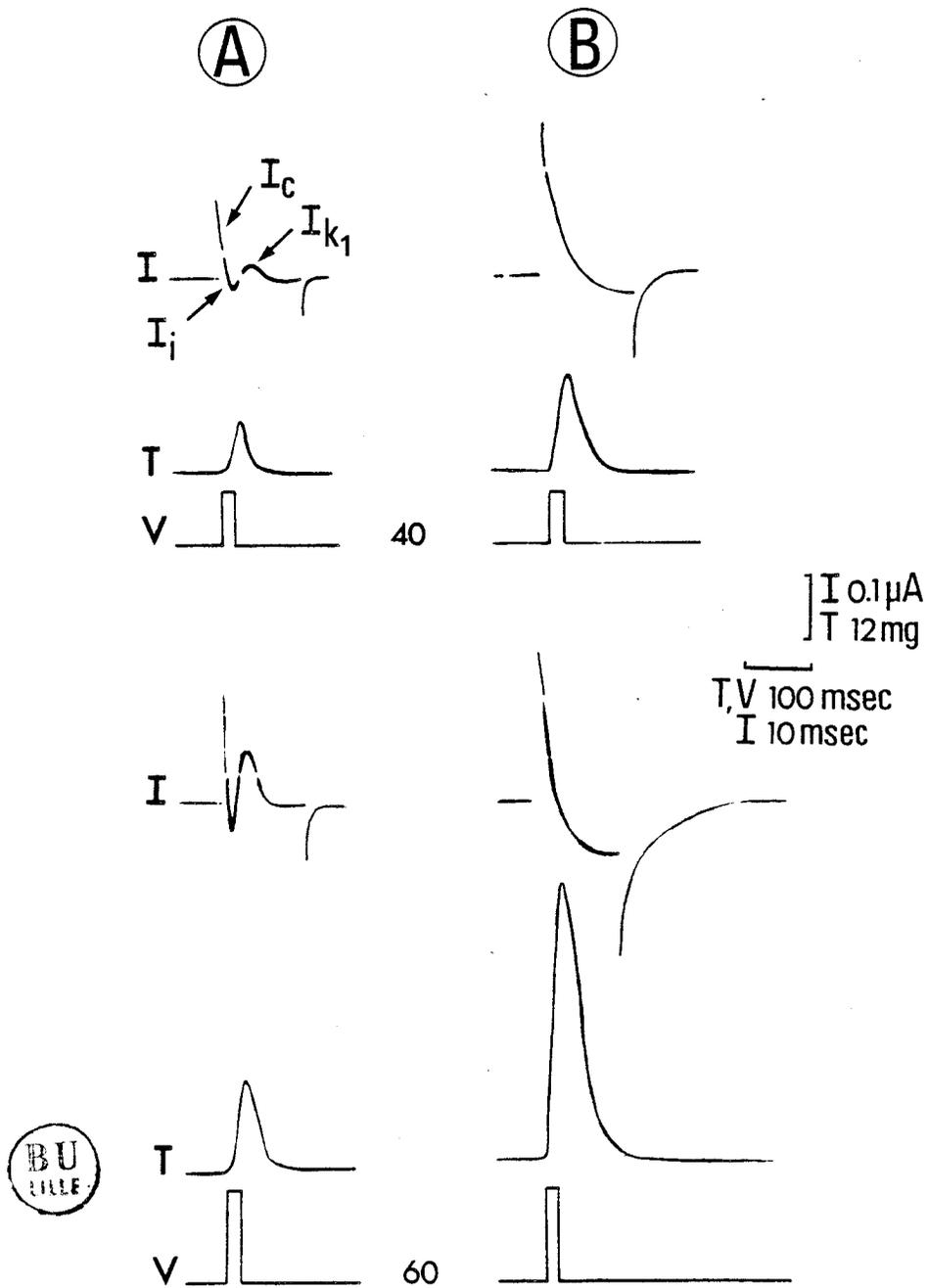


Figure 56 : Comparaison des amplitudes des courants ioniques (I) et des tensions (T) pour une dépolarisation imposée (V) de 40 et 60 mV et de durée 15 msec.

A : en solution physiologique normale

B : en présence de TEA (50 mM)

Fibre n° 210879.

de saccharose est illustré à la figure 56. Pour deux niveaux de dépolarisation imposée (40 et 60 mV) d'une durée courte (15 msec) afin de n'enregistrer que la composante phasique de l'activité mécanique (voir Fig. 24), on compare les enregistrements obtenus en solution physiologique normale (Fig. 56 A) et en présence d'un inhibiteur des courants potassiques : le tétraéthylammonium ou TEA à une concentration de 50 mM (Fig. 56 B). On observe, en solution normale, les courants ioniques décrits par MOUNIER et VASSORT (1975 a et b) : - le courant entrant (I_i), résultat de l'activation simultanée avec des cinétiques similaires du courant entrant calcique, I_{Ca} , et du courant sortant potassique, I_{K1} ; - le courant sortant potassique transitoire, I_{K1} . Le courant sortant potassique retardé, I_{K2} également décrit par MOUNIER et VASSORT (1975 a et b) n'est pas visible car la durée de la dépolarisation est trop courte pour permettre son développement. Les courants I_i et I_{K1} se développent pour les deux niveaux de polarisation illustrés. Ils sont plus amples pour la dépolarisation imposée de 60 mV. Simultanément, une contraction phasique apparaît, plus ample lorsque la dépolarisation imposée est égale à 60 mV.

En présence de TEA, le courant I_{K1} est inhibé et le courant entrant I_i devient de grande amplitude. La contraction phasique dépendante du courant entrant calcique est très nettement augmentée en présence de TEA pour les deux niveaux de polarisation illustrés (Fig. 56B). Il s'en suit donc que l'augmentation importante de I_i en milieu TEA n'est pas uniquement un démasquage par l'inhibition de I_{K1} d'un I_{Ca} déjà existant dans les conditions normales mais une augmentation réelle du flux entrant calcique.

Il semblerait donc que l'augmentation de contraction phasique observée puisse être due à une augmentation du courant calcique entrant. Cette augmentation pourrait être le résultat d'un effet pharmacologique propre du TEA sur le canal calcique. Une autre hypothèse est avancée : le courant sortant I_{K1} et le courant entrant I_{Ca} passeraient par le même canal et le flux sortant d'ions K^+ gênerait l'entrée des ions Ca. En présence de TEA, l'inhibition de I_{K1} faciliterait donc l'entrée des ions Ca.

Cependant, avant d'émettre ces deux hypothèses, il faut s'assurer que l'augmentation de la contraction phasique est due uniquement à l'augmentation de I_{Ca} . Pour cela, il faut vérifier que le TEA qui pénètre dans la cellule n'augmente ni le largage calcique à partir du RS, ni l'affinité des protéines contractiles vis-à-vis du calcium, ni la tension maximale que les protéines contractiles peuvent développer. Enfin, il faut également savoir si le TEA inhibe ou non le pompage du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Tester les effets du TEA sur le réticulum sarcoplasmique et sur les protéines contractiles fait l'objet de la suite de l'exposé.

B - Influence du tétraéthylammonium sur les protéines contractiles *

Le but de cette série de manipulations est l'étude de l'influence du chlorure de TEA (TEA Cl, 50 mM) sur l'activité contractile des fibres musculaires pelées de Crabe, induite par les solutions pCa définies dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

Etant donnée la variabilité des valeurs de tension obtenues d'une fibre à l'autre pour une même concentration calcique, et ceci indépendam-

ment du diamètre de ces fibres, nous avons été amené à tester successivement, sur une même fibre et dans les conditions les plus identiques possibles, les réponses mécaniques induites par une solution de pCa donnée classique et par une solution de même pCa additionnée de TEA Cl.

Deux contrôles préalables ont été effectués de façon à i) vérifier que le RS n'intervient pas en modifiant la concentration calcique au niveau des protéines contractiles lorsque le chlorure de tétraéthylammonium est présent dans la solution, ii) dissocier les effets propres du TEA de ceux des ions chlorure.

1. Contrôles expérimentaux

a - Contrôle de la non-intervention du réticulum sarcoplasmique (Fig. 57).

Nous savons (voir Historique) que le RS joue un rôle capital dans la régulation du calcium, permettant en particulier la relaxation du muscle en captant activement le calcium sarcoplasmique et en l'accumulant.

Il est bien évident qu'en cas d'apport calcique sur la face sarcoplasmique de la membrane réticulaire, les mécanismes de pompage du RS risquent d'être activés. A l'inverse, la théorie "Ca-induced Ca release" permet d'envisager l'hypothèse d'un largage de calcium déclenché par le calcium sensé tester l'activité des protéines contractiles.

C'est pourquoi nous nous assurons que le RS ne modifie pas la réponse contractile induite par diverses solutions pCa. Pour cela, il est

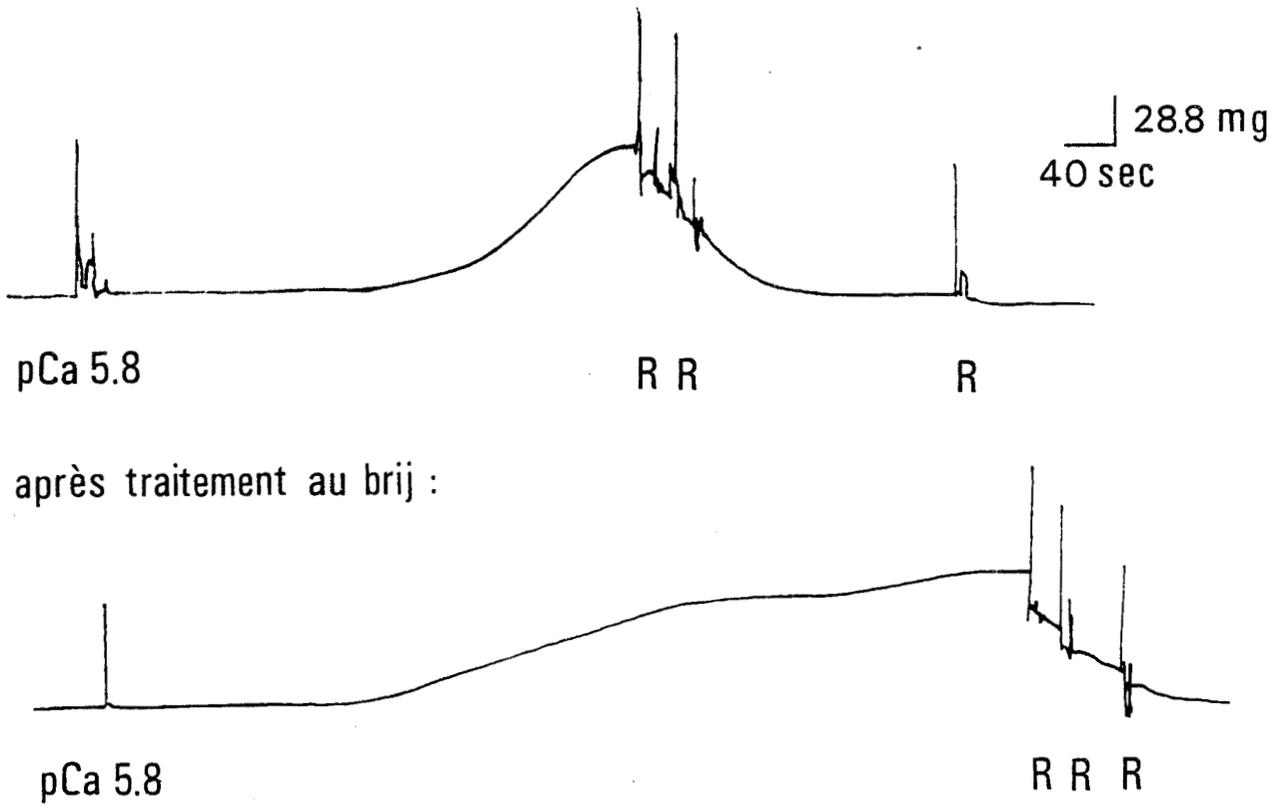


Figure 57 : Rôle du RS lors de l'application d'une solution calcique tamponnée (pCa 5.8) en présence de TEA Cl (50 mM).

La destruction du RS par le traitement brij ne modifie pas l'amplitude de la contraction

Fibre n° 050185.

possible de détruire le RS en imposant à la fibre pelée un bain d'une heure dans une solution de brij à 2 %. Ce détergent est connu pour détruire fonctionnellement le réticulum sarcoplasmique. Dans les conditions physiologiques normales, ce contrôle a déjà été rapporté (voir Fig. 38). Les résultats montrent que, avant et après destruction du RS, la réponse mécanique est identique quelle que soit la pCa testée. Il nous est cependant apparu important de répéter ce contrôle en présence de TEACl, puisque nous ignorions l'influence du TEACl sur le comportement de la membrane du RS et de l'ATPase calcique.

Afin d'effectuer ce contrôle expérimental, une solution de concentration calcique pCa 5.8 contenant du TEACl a été appliquée avant et après traitement au brij. La concentration calcique de pCa 5.8 a été choisie car elle ne permet pas, en présence de TEACl, le développement d'une contraction maximale (voir Fig. 60). De ce fait, toute augmentation ou diminution de l'amplitude de la contraction après destruction du RS sera détectable). Avant traitement au brij, on observe (Fig. 57) qu'après une latence de 253 secondes, une tension se développe avec un temps de mise sous tension maximale égal à 147 secondes et atteint un plateau d'une amplitude de 62 mg. La fibre est ensuite relâchée par plusieurs applications de solution relaxante (R) puis traitée pendant 1 heure par une solution R contenant 2 % de brij. Cette solution de brij doit être très souvent renouvelée car la destruction du RS entraîne une libération de calcium dans le milieu environnant les protéines contractiles, et cette libération induit le développement d'une contraction de longue durée qui fragilise la fibre. Lorsque le traitement brij est terminé, la fibre est lavée une dizaine de fois à l'aide de la solution de lavage, afin d'éliminer toute trace de détergent.

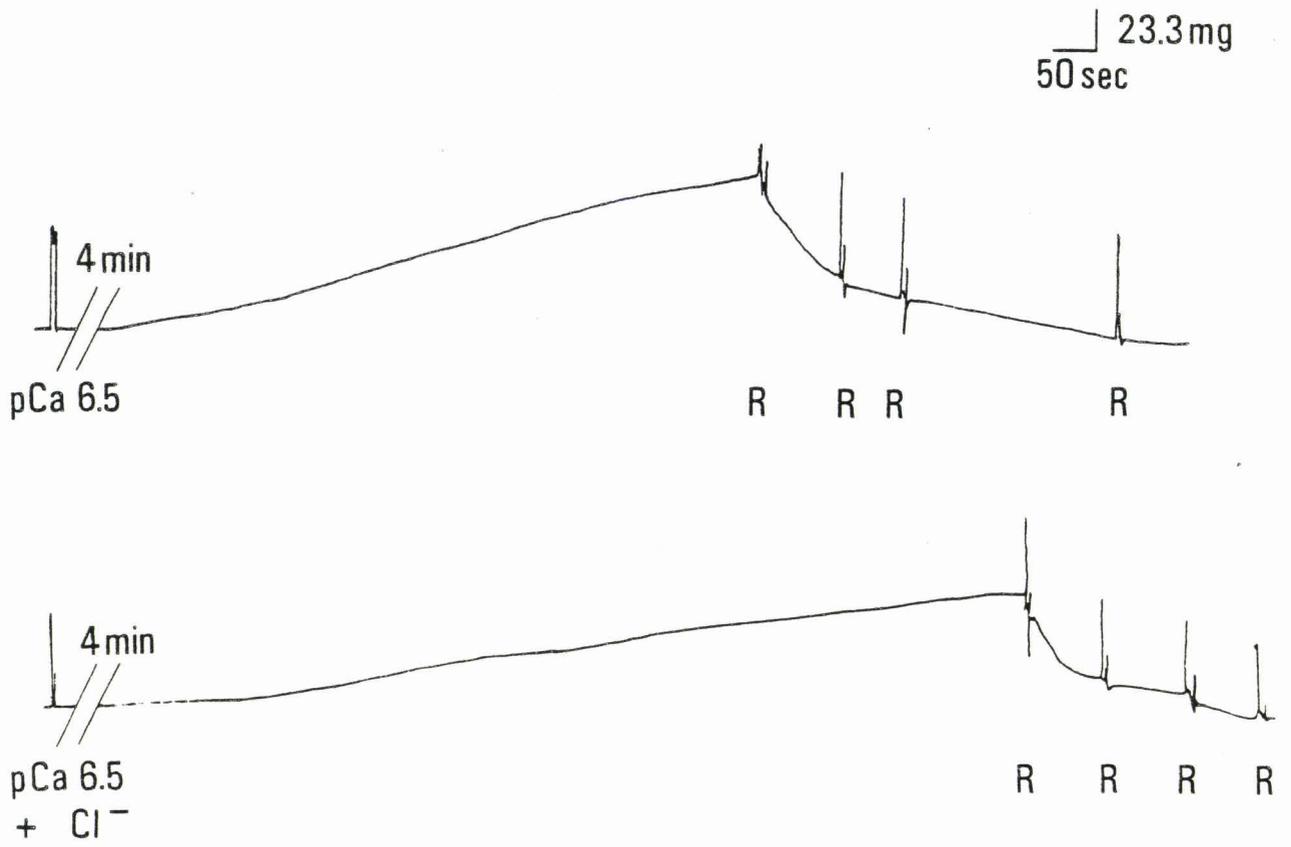


Figure 58 : Effet de Cl⁻ 50 mM sur l'activité des protéines contractiles.
La latence est augmentée, la tension s'affaiblit.

Fibre n° 080385.

Ensuite, une solution pCa 5.8 + TEA Cl est appliquée à nouveau. On observe qu'après une latence de 300 sec, une tension d'amplitude égale à 61.7 mg se développe avec un temps de mise sous tension maximale égal à 620 sec.

On peut conclure que la présence du RS non chargé en calcium par l'expérimentateur ne modifie pas l'amplitude de l'activité mécanique des protéines contractiles. Cependant, on observe un très net ralentissement du développement de la contraction lorsque le RS est détruit. Ce point sera discuté dans le chapitre "Discussion".

b - Effet des ions chlorures sur les protéines contractiles

(Fig. 58).

Dans la mesure où le TEA dont nous désirons déterminer les effets sur les protéines contractiles est apporté sous forme de chlorure, il est intéressant de distinguer les effets respectifs du TEA 50 mM et de Cl^- 50 mM.

Une solution de concentration calcique pCa 6.5 et une solution pCa 6.5 dans laquelle 50 mM de propionate de potassium ont été remplacés par 50 mM de chlorure de potassium (KCl) sont testées successivement.

Les anions perméants, tels Cl^- , ont la propriété de provoquer le largage du calcium par le R.S. (voir Historique et partie largage de ce chapitre). Aussi, est-il encore nécessaire d'exclure toute participation du RS par le traitement au brij, en tenant compte des difficultés que cela suppose. Nous avons donc réduit les tensions mécaniques, mal supportées par la préparation, en étirant la fibre à 110 % de sa longueur de repos

seulement (au lieu de 120 %) et en la soumettant à une concentration relativement faible de calcium (pCa 6.5). Ces précautions ont pour résultat de diminuer l'intensité de la réponse de la fibre, et d'allonger considérablement latence et durée de mise sous tension.

La figure 58 montre que, dans les conditions physiologiques normales, l'application de la solution calcique (pCa 6.5) provoque une tension qui se développe lentement et dont les caractéristiques sont : latence 220 sec ; temps de mise sous tension maximale, 850 sec ; amplitude, 100 mg. Après relaxation de la fibre, la solution pCa 6.5 modifiée est appliquée. Une tension se développe après une latence de 470 secondes ; le temps de mise sous tension maximale est égal à 860 secondes et l'amplitude à 68 mg.

En présence de Cl^- 50 mM, la latence est doublée et l'amplitude de la contraction diminuée d'environ 30 % à pCa 6.5. Le temps de mise sous tension maximale ne semble pas modifié.

2. Relation tension-pCa en présence de chlorure de tétraéthylammonium

a - analyse des enregistrements (Fig. 59)

La figure 59 illustre les contractions obtenues par application de solutions de concentrations calciques variées (pCa 6.0, 5.8 et 4.8) en absence et en présence de TEA Cl.

Que ce soit en absence ou en présence de TEA Cl, on observe que plus la pCa est faible (c'est-à-dire la concentration calcique élevée), plus l'amplitude de la contraction est grande et plus les temps de latence et de mise sous tension maximale sont diminués. La comparaison des tensions obtenues sans et avec TEA Cl amène quelques remarques :

- à pCa 6.0, la tension obtenue en absence de TEA Cl atteint une amplitude de 288 mg, valeur égale à 78 % de la tension maximale obtenue avec une solution pCa 4.8. La latence et le temps de mise sous tension maximale sont respectivement 95 sec et 82 sec. Pour une même concentration calcique, mais cette fois en présence de TEA Cl, l'amplitude de la tension observée (43 mg) est considérablement réduite. Cette valeur correspond à 12 % de la tension maximale obtenue avec une solution pCa 4.8 contenant du TEA Cl. La latence et le temps de mise sous tension sont augmentés. Leurs valeurs sont respectivement 122 sec et 135 sec.



- à pCa 5.8, les différences vont dans le même sens. Sans TEA Cl, l'amplitude de la tension est égale à 323 mg c'est-à-dire 87 % de la contraction maximale en absence de TEA Cl. La latence et le temps de mise sous tension maximale sont égaux respectivement à 45 sec et 72 sec. En présence de TEA Cl l'amplitude est diminuée et la latence et le temps de mise sous tension maximale sont très nettement augmentés. En effet, les caractéristiques de la contraction sont les suivantes : amplitude 144 mg (40 % de la contraction maximale en présence de TEA Cl) ; latence, 210 sec ; temps de mise sous tension maximale, 435 sec.

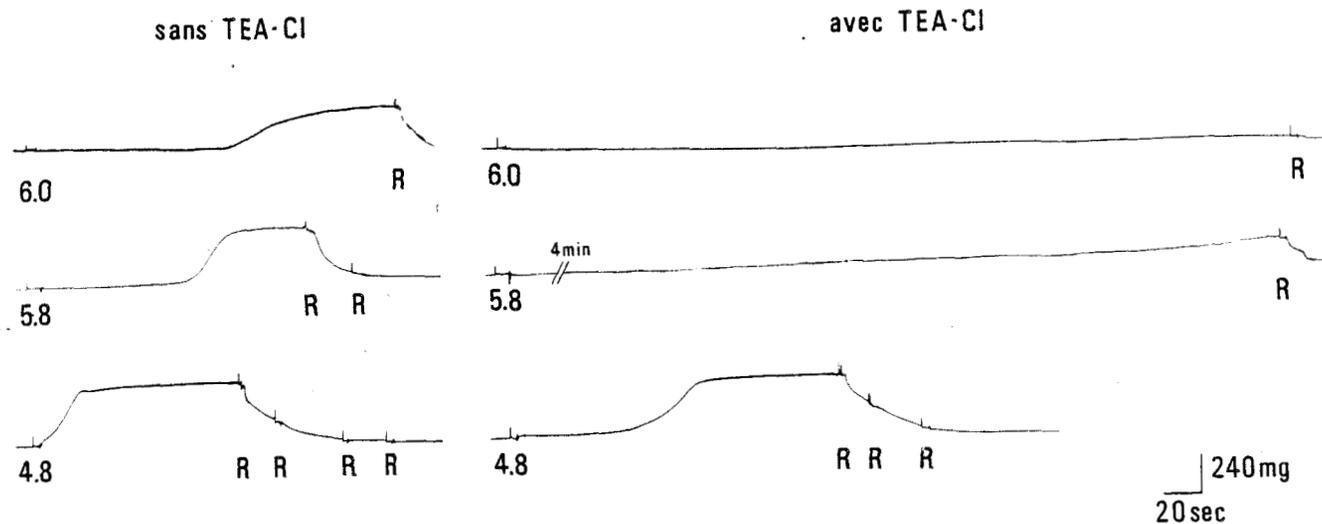


Figure 59 : Effet du TEA Cl à différentes pCa.

La cinétique est affectée pour toutes les valeurs de pCa.

L'amplitude de la contraction est inchangée à pCa 4.8, elle est diminuée pour des concentrations calciques plus faibles et ceci d'autant plus que la pCa est élevée.

pCa 6.0 et 4.8 : fibre n° 151284.

pCa 5.8 : fibre n° 080185.

- pour une pCa de 4.8, les contractions sont d'amplitude comparable dans les deux milieux testés (369 mg sans et 363 mg avec TEA Cl) mais la cinétique est ralentie en milieu TEA Cl puisque sans TEA Cl la latence est nulle et le temps de mise sous tension maximale égal à 72 sec, alors qu'en milieu TEA Cl une latence de 36 sec apparaît et le temps de mise sous tension maximale est de 110 sec.

Ces résultats permettent de mettre en évidence une très nette diminution de la sensibilité des protéines contractiles au calcium et un ralentissement très net de la mise sous tension dans un milieu contenant du chlorure de tétraéthylammonium. Cependant, l'intensité de l'activité mécanique maximale induite par une pCa de 4.8 est inchangée.

b - Etablissement de la courbe tension-pCa (Fig. 60)

Des résultats similaires obtenus sur une autre fibre sont illustrés à la figure 60 sous la forme d'une courbe exprimant l'amplitude de la contraction en fonction de pCa (relation T/pCa). Les amplitudes ont été reportées en pourcentage de la contraction maximale induite dans les deux milieux pour pCa 4.8. On observe qu'en absence de TEA Cl le seuil de déclenchement de la contraction se situe pour une pCa égale à 6.6. Puis, plus la pCa est faible, plus l'amplitude de la tension est grande ; elle atteint un maximum pour une pCa voisine de 6.0. Ce maximum se maintient pour des pCa plus faibles. La valeur de pCa pour laquelle la tension est égale à 50 % de la tension maximale (pCa₅₀) est égale à 6.46.

En présence de TEA Cl la courbe T/pCa est très nettement déplacée vers les pCa plus faibles. Le seuil de développement de la contraction est

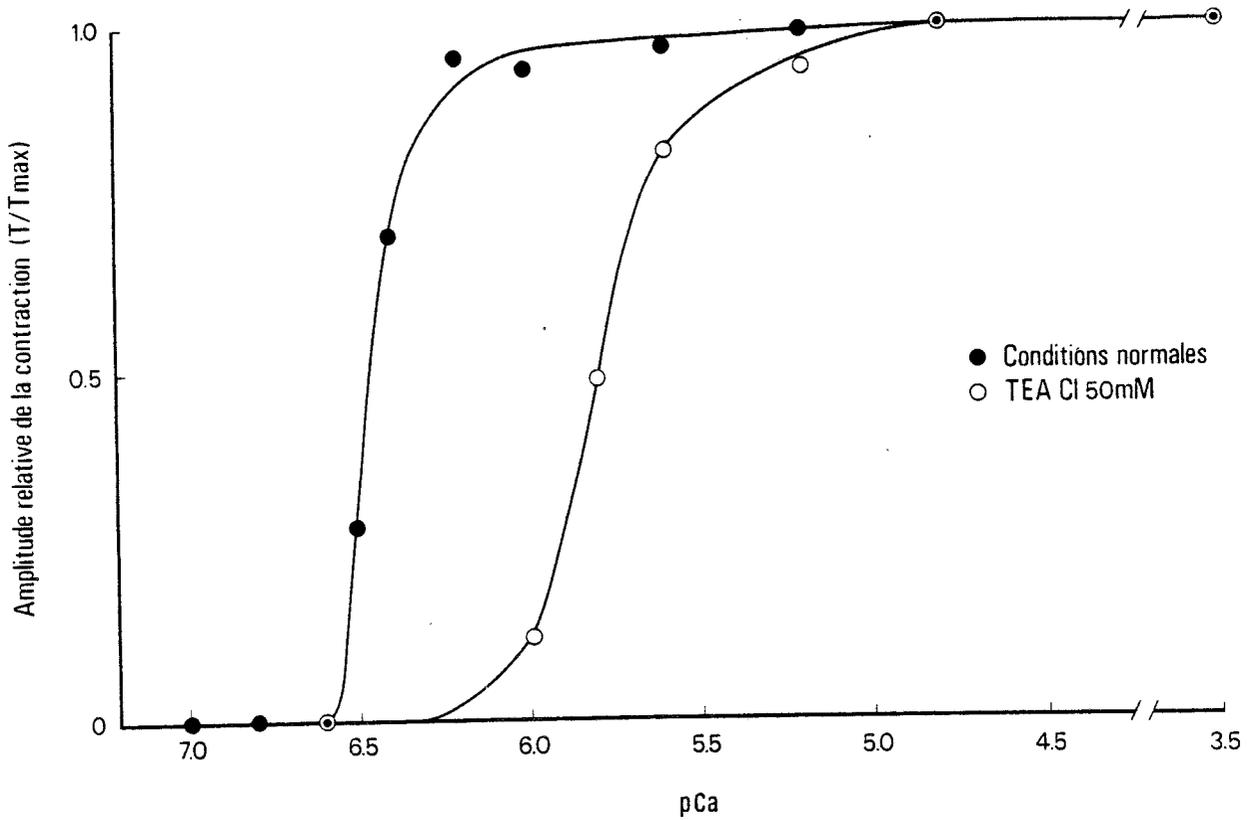


Figure 60 : Evolution de l'amplitude de la contraction relative (ordonnée) en fonction de la valeur de pCa (abscisse) dans les conditions normales (●) et en présence de TEA Cl (50 mM) (○).

Sans TEA Cl fibre n° 150484

Avec TEA Cl fibre n° 151284

voisin de pCa 6.3. L'amplitude de la contraction atteint ici un maximum pour une pCa égale à 4.8. Pour des pCa plus faibles (pCa 3.5) ce maximum est maintenu. La valeur de pCa pour laquelle la tension est égale à 50 % de T_{\max} est égale à 5.8.

En conclusion, trois points peuvent être mis en évidence :

- le déplacement du seuil de 0.4 unités pCa vers les pCa plus faibles en présence de TEA Cl met en évidence une diminution de la sensibilité des protéines contractiles au calcium.

- la très nette diminution de la valeur de pCa_{50} en milieu TEA Cl met en évidence une diminution importante de l'affinité des sites calciques de la troponine.

- la diminution de la pente de la relation T/pCa en milieu TEA Cl serait l'indice d'une diminution du nombre de sites calciques de la troponine impliqués dans l'activation de la contraction. En effet, les valeurs du coefficient de Hill (n_H) en conditions normales et en présence de TEA (50 mM) sont respectivement égales à 5.74 et 2.29. Les coefficients de corrélation sont 0.99 et 0.94.

c - Réversibilité (Fig. 61)

Connaissant les effets importants du TEA Cl sur les protéines contractiles, nous avons voulu savoir si cet effet était réversible. C'est pourquoi nous avons effectué l'expérience illustrée à la figure 20. Une solution pCa 5.8 a été appliquée. Une contraction (a) se développe avec une amplitude de 237 mg, une latence et un temps de mise sous tension maximale respectivement égaux à 85 sec et 121 sec. Après relaxation induite

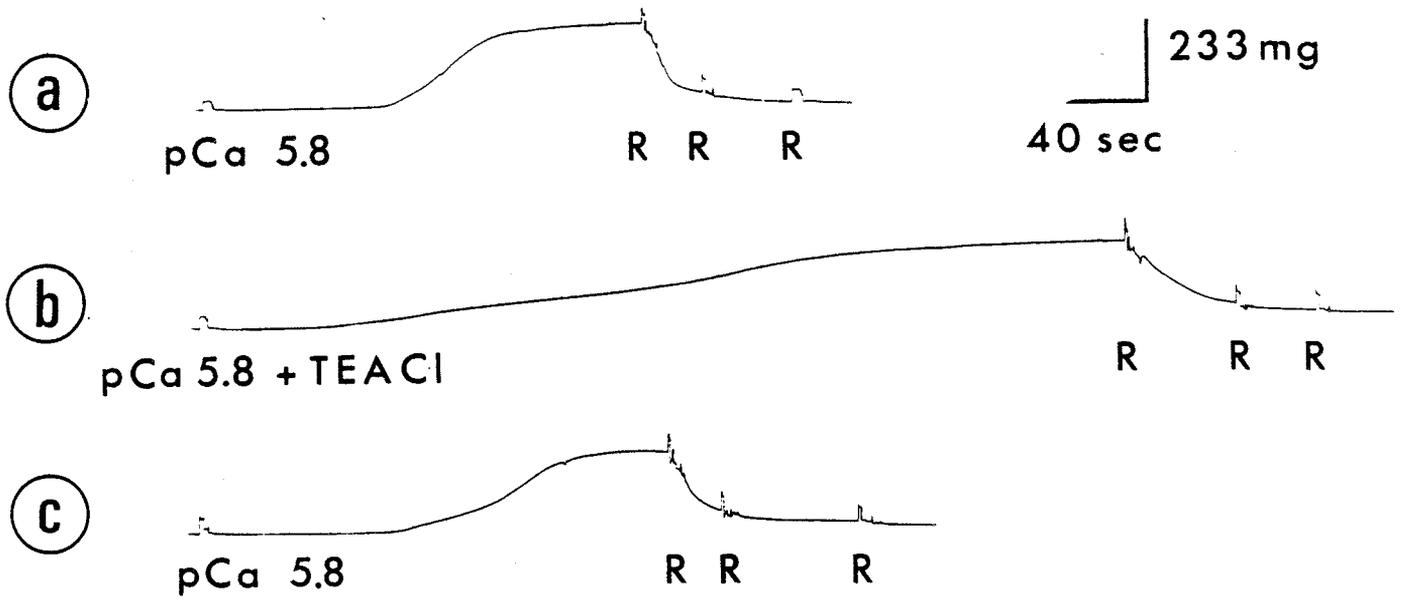


Figure 61 : Réversibilité d'action du TEA Cl sur les protéines contractiles. Pour une pCa 5.8 et après une contraction en présence de TEA Cl, la cinétique et l'amplitude de la tension sont rétablies par un retour aux conditions normales.

Fibre n° 190685.

par application multiple de la solution relaxante (R), une solution de même pCa contenant du TEA Cl est appliquée. Une contraction (b) se développe alors lentement avec une latence de 528 sec et un temps de mise sous tension maximale de 375 sec ; elle atteint un plateau de 224 mg d'amplitude. Une fois relâchée la solution pCa 5.8 est à nouveau appliquée. Les caractéristiques de la contraction (c) obtenue sont les suivantes : amplitude, 239 mg ; latence 90 sec ; temps de mise sous tension maximale 128 sec.

Cette expérience confirme la diminution de l'amplitude de la contraction induite par pCa 5.8 ainsi que le ralentissement de son développement sous l'influence du TEA Cl. L'effet du TEA Cl s'avère réversible puisque une nouvelle application de la solution pCa 5.8 sans TEA induit un retour à des caractéristiques proches de celles de la première contraction. Notons cependant que la récupération de la cinétique de la contraction n'est pas totale. Nous pensons que ce fait n'est pas dû à une réversibilité partielle, mais à un léger effet de fatigue de la préparation.

En conclusion, le traitement classique exécuté entre deux contractions, c'est-à-dire l'application de la solution R puis le double lavage par la solution W, suffit à éliminer les effets d'un bain préalable de TEA Cl sur les tensions pCa à venir. Nous verrons l'importance de cette constatation pour l'étude du pompage calcique par le RS en présence de TEA Cl.

3 - Conclusion

Les effets du chlorure de tétraéthylammonium sur les protéines contractiles sont tels que la sensibilité des protéines contractiles au calcium,

l'affinité des sites calciques de la troponine et le nombre de sites calciques impliqués dans la contraction sont nettement diminués. Nous avons montré également que ces effets ne sont dus ni à une modification du comportement de la fibre par les contractions préalables induites par des solutions sans TEA Cl (voir Fig. 37) ni à une conséquence d'un effet du TEA Cl sur le réticulum sarcoplasmique qui capturerait ou larguerait des ions calciques (voir Fig. 57). De plus, les effets observés sont largement attribuables à une action propre du tétraéthylammonium et non des ions chlorures, car nous avons rapporté (voir Fig. 58) qu'en présence de chlorures une contraction induite par pCa 6.5 (50 mM) n'est diminuée que de 30 % alors qu'en milieu TEA Cl elle est totalement inhibée. Le temps de mise sous tension maximale, inchangé en présence d'ions chlorures, est très nettement augmenté en milieu TEA Cl. Seul l'allongement de la latence observée en présence de TEA Cl pourrait être imputé aux ions chlorures.

C - Tétraéthylammonium et réticulum sarcoplasmique

Notre projet est l'étude des effets du TEA Cl sur la capacité de la membrane réticulaire à larguer le calcium et sur l'efficacité de l'ATPase calcique de cette même membrane à faire entrer le calcium dans la lumière du réticulum sarcoplasmique. Nous envisageons initialement d'effectuer cette étude en évaluant l'amplitude du largage et l'intensité du pompage par l'intermédiaire de la mesure de l'amplitude de la tension mécanique développée. Or, les effets importants du TEA Cl sur les protéines contractiles, décrits au chapitre précédent, nous ont amené à reconsidérer la question.

En particulier, dans le cas de l'étude du largage, il est impossible de faire agir le TEA Cl sur la libération de calcium sans, en même temps,

modifier la réponse des protéines contractiles. La technique de l'arsenazo III présentée dans le chapitre "Matériel et Méthodes" nous permettra donc de détecter plus directement l'amplitude du largage calcique, par la mesure de la variation d'absorption lumineuse proportionnelle à la variation de la concentration calcique du myoplasme. Cette technique nous permettra également, après avoir pris soin de déterminer les courbes d'étalonnage en milieu caféinique et en milieu caféine + TEA Cl, de quantifier le largage calcique.

Dans l'étude de l'effet du TEA Cl sur le pompage, bien que le protocole expérimental soit tel qu'il ne nécessite pas l'application de la drogue pendant le développement de l'activité mécanique des protéines contractiles mais pendant la charge calcique préalable du RS, nous avons effectué certaines expériences en arsenazo afin d'évaluer avec plus de précision le largage consécutif à un pompage modifié ou non par le TEA Cl. Pour d'autres expériences, le largage calcique a été simplement évalué par le développement de l'activité mécanique.

Nous allons donc dans ce paragraphe présenter les résultats relatifs aux effets du TEA Cl sur, d'une part le largage calcique et, d'autre part l'activité de l'ATPase calcique.

1. Largage du calcium par le réticulum sarcoplasmique *

a - Action du chlorure de tétraéthylammonium

Les effets du TEA Cl 50 mM sur le largage calcique sont illustrés à la figure 62. Le protocole expérimental est ainsi défini : la fibre montée dans la solution relaxante est lavée deux fois dans la solution W + 0.1 mM

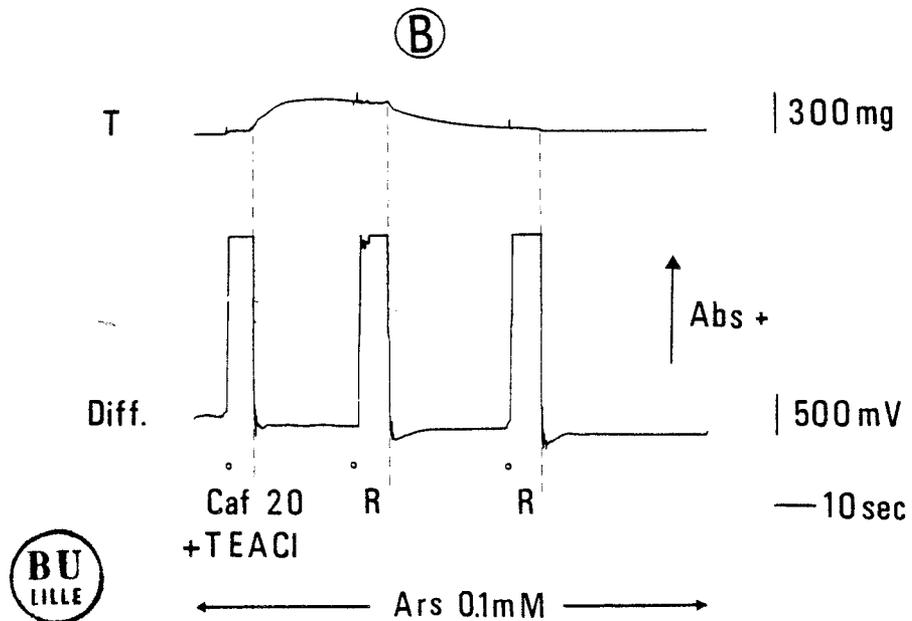
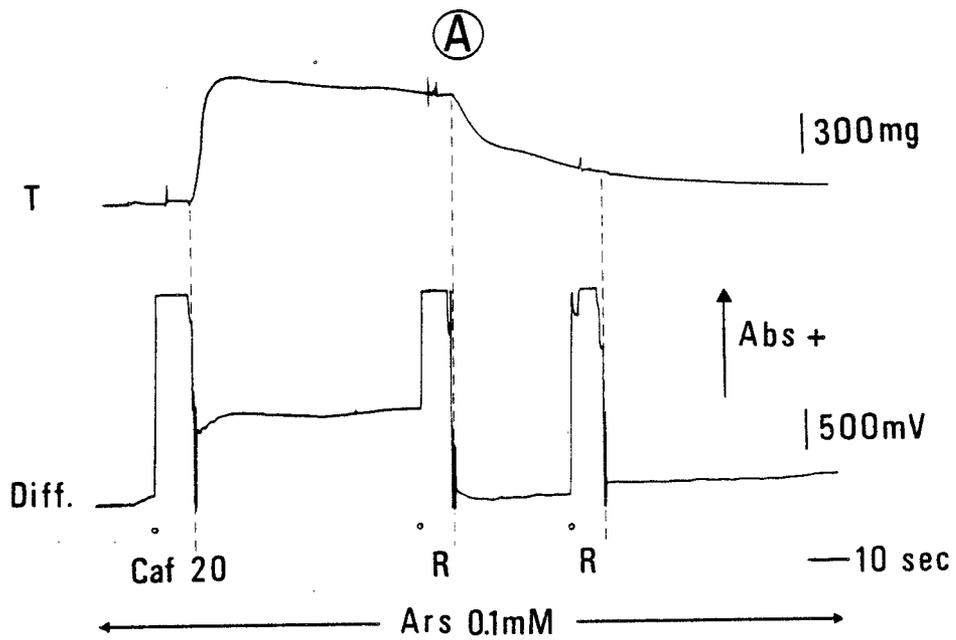


Figure 62 : Effet du TEA Cl sur le largage calcique.

Enregistrements de la tension caféinique (T) et du signal différentiel (Diff.) en arsenazo III (Ars 0.1 mM) induite par une solution caféinique 20 mM sans TEA Cl (Caf 20) ou avec TEA Cl 50 mM (Caf 20 + TEA Cl) après une charge calcique maximale (pCa 6.6, 5 min.).

A : largage induit en absence de TEA Cl

B : largage induit en présence de TEA Cl.

Fibre n° 110785.

arsenazo. Le niveau zéro est réglé à cette occasion. Puis le RS est chargé pendant 5 minutes; par une solution pCa 6.6 sans arsenazo afin de ne pas chélater le calcium présent dans la solution et par voie de conséquence diminuer la concentration en calcium libre de cette solution. Après un autre double lavage (W et 0.1 mM arsenazo), permettant d'éliminer toute trace de calcium de la solution précédente, le largage est induit en absence ou en présence de TEA Cl, par une solution de caféine 20 mM contenant 0.1 mM d'arsenazo. Le développement de la contraction (T) et la variation d'absorption lumineuse au niveau du signal différentiel (Diff.) sont enregistrées simultanément.

On observe qu'en absence de TEA Cl (Fig. 62 A) une contraction d'amplitude égale à 1027 mg se développe sans latence, avec un temps de mise sous tension maximale de 10 secondes. Simultanément, une augmentation de l'absorption différentielle de 1125 mV apparaît avec un temps de montée égal à 9 secondes. D'après la courbe d'étalonnage la variation d'absorption lumineuse observée équivaut à un accroissement de la concentration calcique dans le myoplasme de 116 μ M.

En présence de TEA Cl (Fig. 62 B) l'amplitude de la tension est de 300 mg, la latence nulle et le temps de mise sous tension maximal égal à 17 secondes. Le signal différentiel n'accuse aucune variation notable.

Ce résultat observé sur 3 autres fibres nous conduit donc à conclure qu'en présence de TEA Cl le largage calcique est fortement diminué.

L'absence de signal différentiel alors qu'une contraction se développe sera discuté dans le chapitre "Discussion".

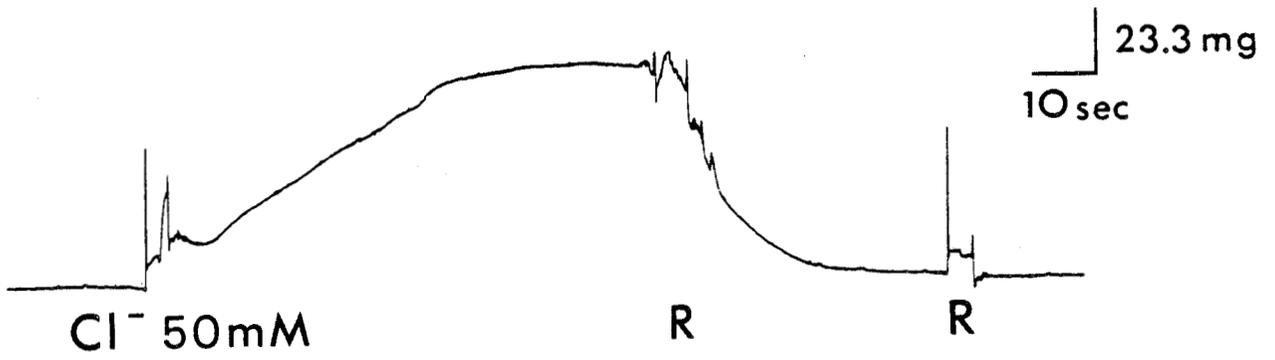


Figure 63 : Induction d'un largage calcique par les ions chlorure.
 Enregistrement d'une contraction induite par 50 mM d'ions chlorures
 (Cl⁻ 50 mM) après une charge calcique de longue durée (5 min, pCa 6.6).
 Fibre n° 030385.

Cette nette diminution du largage calcique semble être le résultat d'un effet propre du TEA et non celui d'une action des ions chlorures puisqu'il est depuis longtemps connu que les ions chlorures induisent au contraire du TEA Cl un largage calcique. Nous avons cependant voulu vérifier si tel était l'effet de 50 mM de chlorure sur la fibre musculaire de Crabe.

b - Effet des ions chlorure sur le largage calcique par le RS (Fig. 63)

Dans la mesure où nous voulions simplement vérifier que les ions chlorures ont un effet opposé au TEA Cl sur le largage calcique, il ne nous a pas semblé nécessaire d'utiliser une technologie lourde et d'analyse complexe telle que la technique de l'arsenazo III dans cette expérience. Par conséquent le largage calcique a été évalué par le seul développement de la contraction.

Le réticulum sarcoplasmique est chargé dans les mêmes conditions que celles décrites à la figure 62 c'est-à-dire par une solution pCa 6.6 durant 5 minutes. Après avoir lavé deux fois la fibre, une solution W modifiée est appliquée (50 mM de propionate de potassium sont remplacés par 50 mM de chlorure de potassium. On observe le développement d'une contraction de 77 mg avec un temps de mise sous tension maximale égal à 60 secondes.

c - Conclusion

Le chlorure de tétraéthylammonium à une concentration de 50 mM diminue fortement le largage calcique. La diminution induite par le seul

ion tétraéthylammonium doit être encore plus importante que celle observée à la figure 22 puisque l'ion chlorure a un effet inverse de stimulation du largage calcique.

2. Capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique *

Afin de déterminer l'influence du TEA Cl sur la capture du calcium par l'ATPase calcique du RS, les expériences sont effectuées en présence d'arsenazo III.

Le protocole expérimental est le suivant : la fibre montée dans la solution relaxante est lavée deux fois par la solution de lavage W contenant 0.1 mM d'arsenazo. Le RS est ensuite chargé par une solution pCa 6.6 avec ou sans TEA Cl (50 mM) ne contenant pas d'arsenazo afin de ne pas chélater le calcium. Après un temps de charge variable (10 sec, 5 min), la solution W contenant de l'arsenazo est à nouveau appliquée afin d'ôter toute trace d'ions calcium de la solution précédente, puis la fibre est soumise à la solution caféinique (20 mM) contenant 0.1 mM arsenazo.

a - Action du chlorure de tétraéthylammonium sur une charge calcique inframaximale

Expériences effectuées en présence d'arsenazo .

La figure 64 illustre les résultats obtenus sur une même fibre après 10 secondes de charge calcique sans puis avec TEA Cl (50 mM). La durée de 10 sec a été choisie car l'on sait d'après des travaux préalables (voir Fig. 34) qu'elle est insuffisante, en absence de TEA Cl, pour

induire une charge maximale du RS. De ce fait toute augmentation éventuelle de la charge calcique sous l'effet du TEA Cl sera décelable. De haut en bas sont reportées la contraction musculaire (T) et la variation d'absorption lumineuse du signal différentiel 660 nm - 570 nm multiplié par 10 (Diff.). Le niveau de référence des enregistrements des variations d'absorption lumineuse correspond au niveau enregistré en solution W contenant 0.1 mM arsenazo.

Lorsque la charge calcique a été effectuée en absence de TEA Cl (Fig. 64 A), on observe lors de l'application de la solution caféinique (20 mM), le développement d'une contraction d'amplitude égale à 255 mg et simultanément une augmentation d'absorption lumineuse différentielle égale à 2100 mV. Le temps de mise sous tension maximale est de 21 sec et le temps de montée du signal différentiel proche de 28 sec. D'après la courbe d'étalonnage du signal différentiel en milieu caféinique (20 mM) sans TEA, l'augmentation de la concentration calcique myoplasmique mesurée par l'arsenazo est égale, dans cette expérience à 216.49 μ M. Il s'ensuit donc que la qualité globale de calcium larguée est égale à 216.49 μ M à laquelle s'ajoute la quantité de calcium fixée sur la troponine enregistrée à l'aide de la contraction.

Une expérience identique a été effectuée en présence de TEA Cl (50 mM) dans la solution de charge (Fig. 64 B). Les résultats montrent que lors de l'application de la solution caféinique, une contraction de 210 mg se développe et une augmentation d'absorption lumineuse du signal différentiel égale à 1550 mV apparaît. Le temps de mise sous tension maximale est égal à 208 sec et le temps de montée du signal différentiel est voisin de

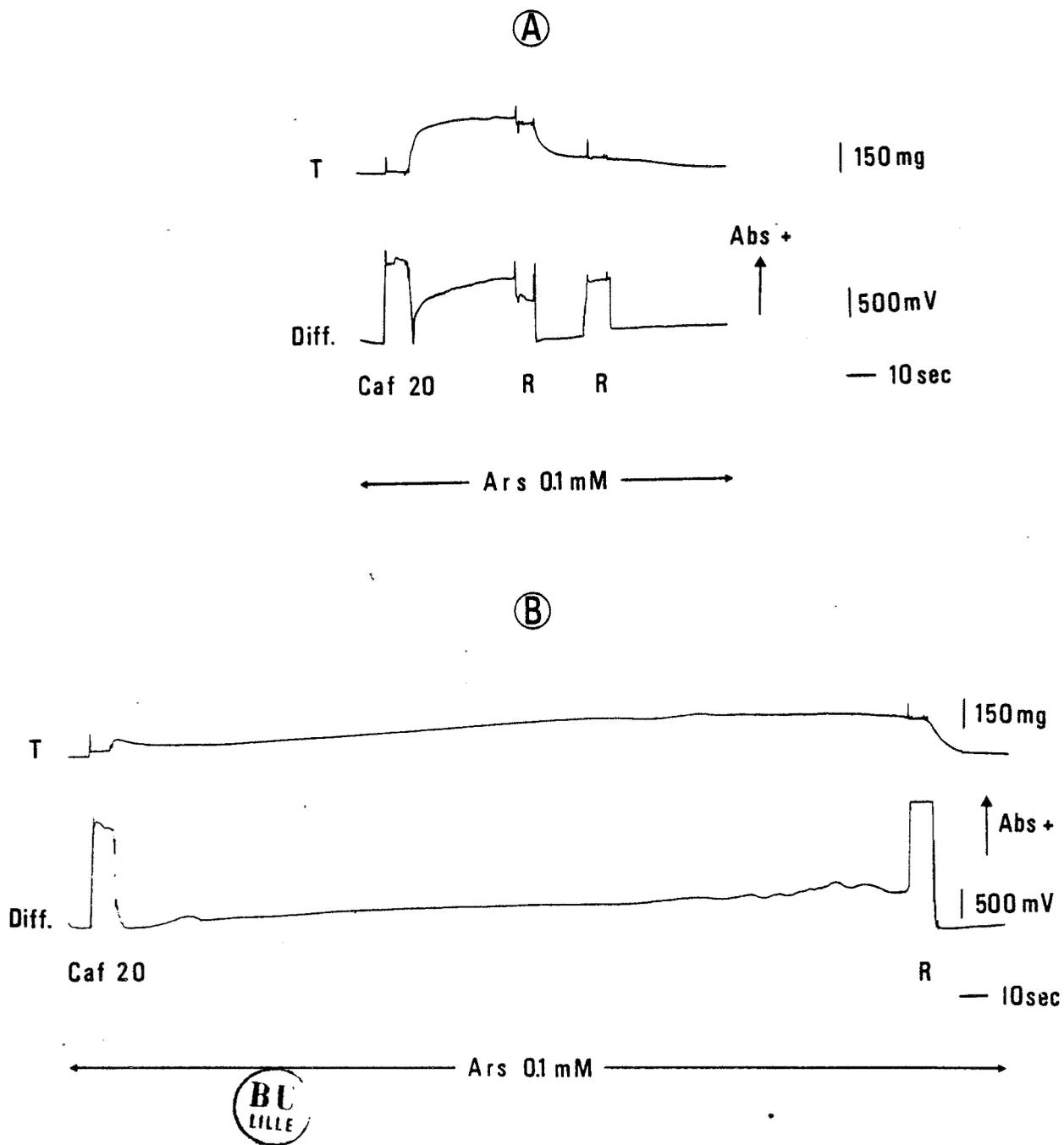


Figure 64 : Effet du TEA Cl sur la capture de calcium par le RS pour une charge de durée 10 secondes.

Enregistrements de la tension caféinique (T) et du signal différentiel (Diff.) en arsenazo III (Ars. 0.1 mM) induite par une solution caféinique 20 mM (Caf 20) après une charge calcique inframaximale du RS (10 sec, pCa 6.6) en absence (A) ou en présence (B) de TEA Cl (50 mM).

Fibre n° 090785.

253 sec. D'après la courbe d'étalonnage du signal différentiel obtenue en milieu caféinique (20 mM) sans TEA, l'augmentation d'absorption lumineuse observée correspond à un accroissement de la concentration calcique myoplasmique de 159.79 μM . Donc, lorsque la charge calcique a été effectuée en présence de TEA Cl, le largage calcique consécutif, mesuré par l'amplitude du signal différentiel et l'amplitude de la contraction, est diminué. La vitesse de largage, évaluée par le temps de montée du signal différentiel et le temps de mise sous tension maximale, est plus faible.

En conclusion, on observe un largage réduit et moins rapide après une charge calcique en présence de TEA Cl. Cette diminution du largage est la conséquence d'une quantité réduite de calcium disponible dans le RS. Cela signifie que la charge calcique induite par la solution pCa 6.6 durant 10 secondes a été réduite par la présence du TEA Cl.

Expériences effectuées en absence d'arsenazo

Certaines expériences identiques à celle exposée dans le paragraphe précédent ont été effectuées en absence d'arsenazo. L'amplitude du largage calcique a été évaluée par l'amplitude de la tension. Les résultats obtenus après une charge calcique à l'aide de la solution pCa 6.6 pendant 10 sec sans puis avec TEA Cl sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	sans TEA	avec TEA
	T (mg)	T (mg)
n	4	3
\bar{x}	191.08	131.1
$\frac{b}{\sqrt{n}}$	29.15	25.4

 Les résultats sont présentés sous la forme $\bar{x} \pm \frac{b}{\sqrt{n}}$ (erreur standard par rapport à la moyenne).

On observe comme dans les expériences effectuées à l'aide de l'arsenazo une diminution de l'amplitude du largage calcique traduisant une altération du pompage calcique par le TEA Cl.

b - Action du chlorure de tétraéthylammonium sur une charge calcique maximale

Une expérience identique à celle illustrée à la figure 63 a été réalisée après charge calcique du RS à l'aide de la solution pCa 6.6 pendant 5 minutes (Fig. 65). Le protocole expérimental, excepté le temps de charge, est rigoureusement identique à celui utilisé dans l'expérience de la figure 24. Notons que la durée de 5 minutes a été choisie car des expériences préalables (voir Fig. 34) ont montré qu'elle permet une charge calcique maximale du RS.

Les résultats montrent que dans le cas d'un pompage effectué en absence de TEA Cl, l'application de la solution caféinique induit une augmentation d'absorption lumineuse du signal différentiel d'amplitude égale à 800 mV et le développement d'une tension biphasique dont le pic et le plateau sont d'amplitudes respectivement égales à 217.5 mg et 150 mg. Le temps de montée du signal différentiel et le temps de mise sous tension maximale sont respectivement 32.25 sec et 1.75 sec. D'après la courbe d'étalonnage l'augmentation de la concentration calcique mesurée par l'arsenazo est égale à 82.47 μM .

Lorsque le pompage a été effectué en présence de TEA Cl (50 mM) un signal différentiel de 850 mV apparaît et une tension biphasique se développe. L'amplitude du pic est égale à 165 mg puis la tension se stabilise à une amplitude de 66.25 mg. Le temps de montée du signal différentiel et le temps de mise sous tension maximale sont 61.5 sec et 1.5 sec respectivement. Dans ces conditions, l'arsenazo a mesuré une augmentation de concentration calcique myoplasmique égale à 87.63 μM .

Les résultats obtenus dans le cadre de cette dernière expérience sont difficilement analysables puisque l'on observe une très légère augmentation de la $[\text{Ca}]$ myoplasmique mesurée par l'arsenazo et une nette diminution de la contraction. Cette diminution de la contraction est due à une diminution de la quantité de calcium fixé sur la troponine puisque nous savons qu'il n'y a pas d'effet rémanent du TEA Cl sur les protéines contractiles après un double lavage à l'aide de la solution W (voir Fig. 61). L'importance de la diminution de la tension (55.83 %) comparée à la faible augmentation du calcium myoplasmique (6.25 %) laisse supposer que lorsque le pompage a été effectué en présence de TEA Cl, le largage calcique est diminué, conséquence d'une diminution de la charge calcique maximale du RS. Cette conclusion est renforcée par la diminution de la vitesse de largage

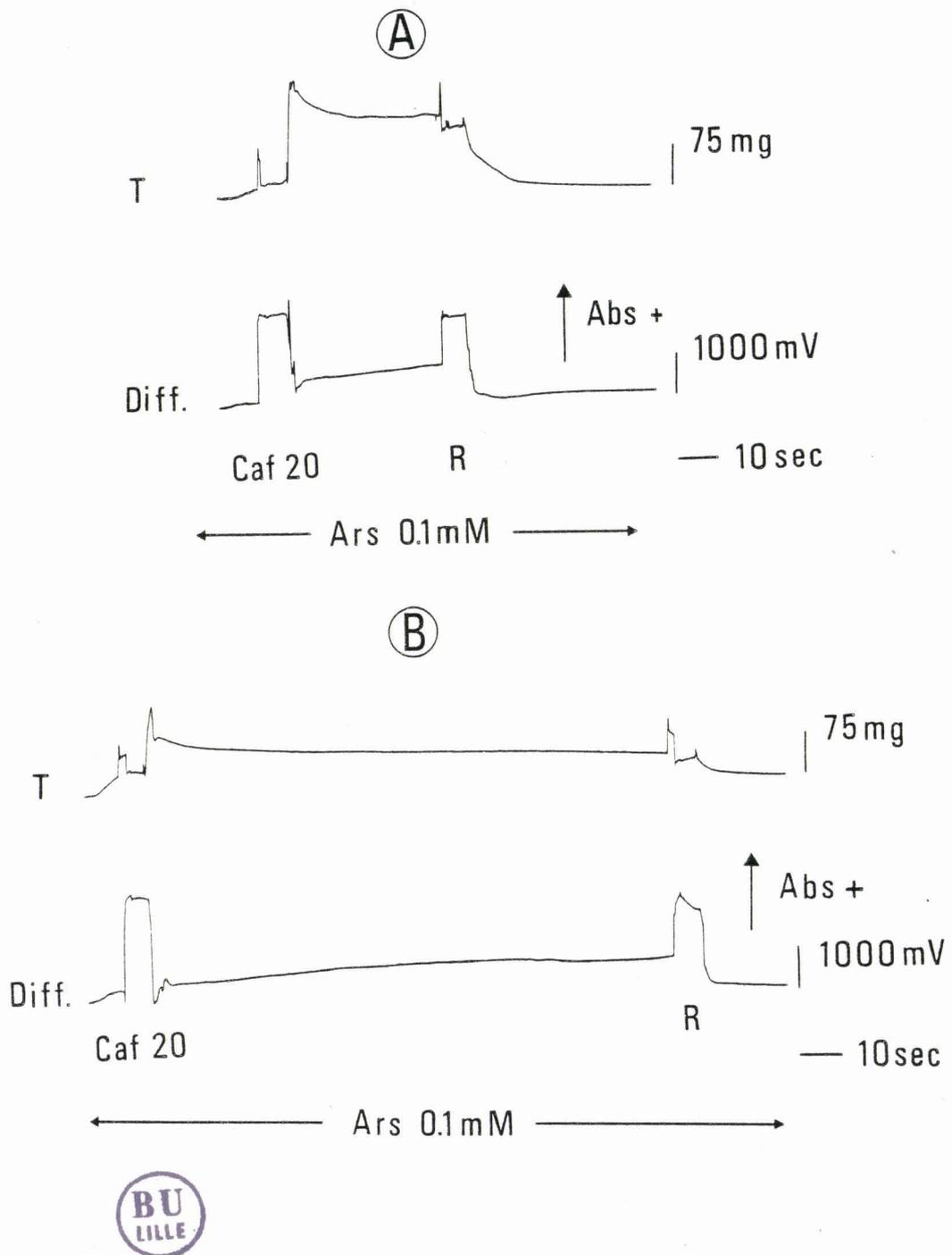


Figure 65 : Effet du TEA Cl sur la capture de calcium par le RS pour une charge de durée 5 minutes.

Enregistrements de la tension caféinique (T) et du signal différentiel (Diff.) en arsenazo III (Ars 0.1 mM) induits par une solution caféinique 20 mM (Caf 20) après une charge calcique maximale du RS (5 min, pCa 6.6) en absence (A) ou en présence (B) de TEA Cl (50 mM).

Fibre n° 050785.

observée au niveau du signal différentiel. L'existence de tensions biphasiques rend l'analyse des temps de mise sous tension maximale inutilisable. Ce phénomène sera discuté dans le chapitre "Discussion".

c - Conclusion

Les résultats montrent que le chlorure de tétraéthylammonium diminue la vitesse de capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique puisque la quantité de Ca présente dans le RS après une charge calcique inframaximale est inférieure lorsque le chlorure de tétraéthylammonium est présent dans la solution de charge. Des modes d'action possibles du tétraéthylammonium au niveau de l'ATPase calcique seront discutés dans le chapitre "Discussion".

3. Influence du TEA sur le mécanisme de "calcium-induced calcium release"

Dans le cadre de cette étude deux types d'expériences ont été réalisés. D'une part, nous avons déterminé l'effet d'une concentration donnée de TEA sur la contraction induite par une solution de concentration calcique faible ainsi que sur la plus petite concentration calcique capable d'induire un largage calcique à partir du RS. D'autre part, nous avons étudié l'effet de concentrations variées de TEA sur un largage calcique induit par une solution de concentration calcique faible additionnée de 0.5 mM de caféine.

a - Modifications des caractéristiques du mécanisme de "Ca-induced Ca release" par le TEA

L'action du TEA sur le largage calcique induit par une solution de

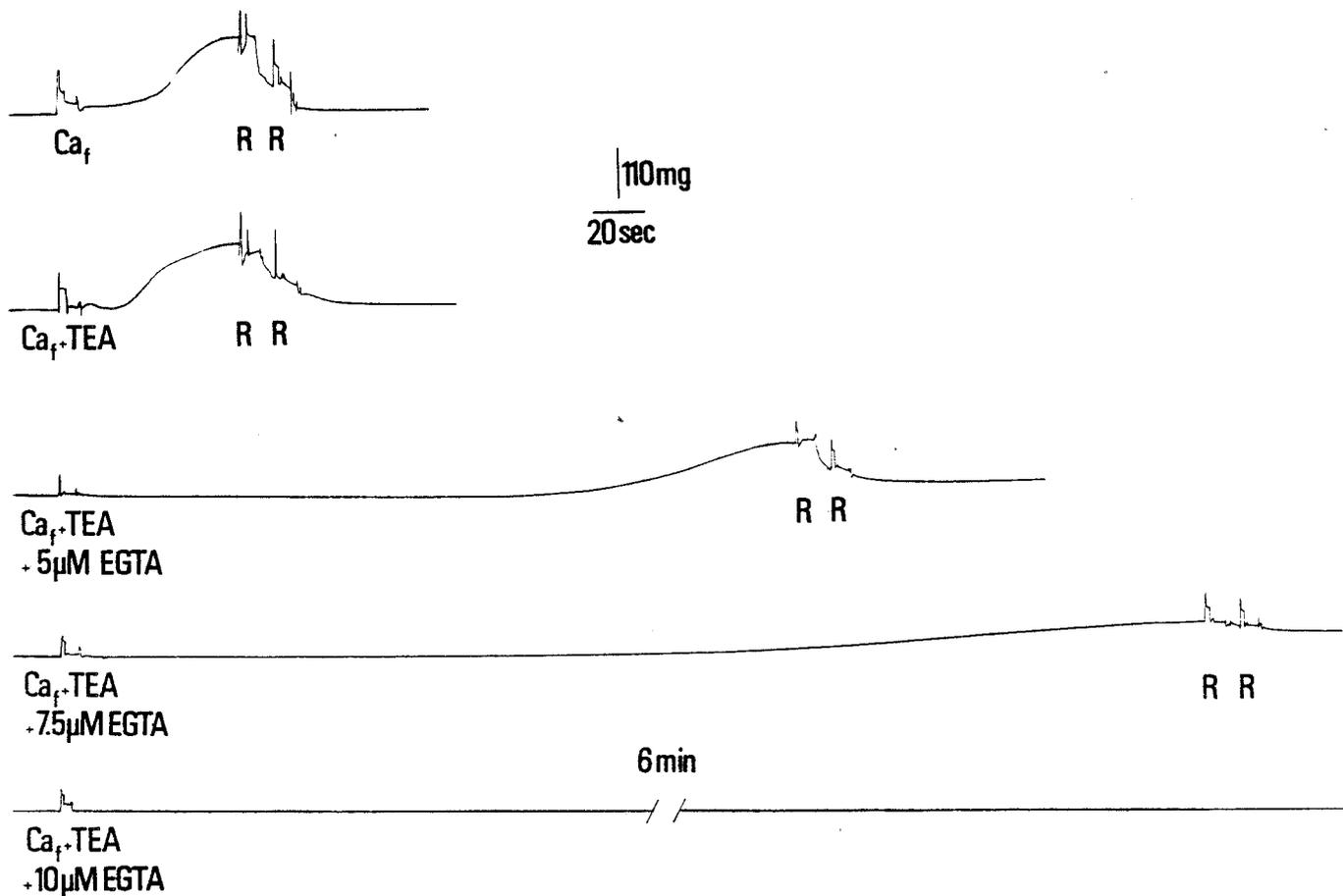


Figure 66 : Influence du TEA Cl sur le mécanisme de "Ca-induced Ca release". De haut en bas, enregistrements des contractions induites après charge calcique maximale (pCa 6.6, 5 min) du RS, par une solution de concentration calcique faible (Ca_f) (1ère ligne de tracé) :

- en présence de TEA Cl 10 mM: Ca_f + TEA (2ème ligne de tracé)
- en présence d'EGTA ajouté à la solution Ca_f + TEA aux doses de 5, 7.5 et 10 μ M (3ème, 4ème et 5ème lignes de tracés).

Les contractions sont relâchées par la solution relaxante R.

Fibre n° 081182.

concentration calcique faible a été étudiée à l'aide de l'expérience illustrée à la figure 66. Après avoir chargé le RS en calcium (pCa 6.6, 5 min), une solution de concentration calcique faible est appliquée. Une contraction d'amplitude égale à 156.75 mg se développe en 50 sec. La fibre se relâche lors de l'application de la solution relaxante. Le RS est une nouvelle fois chargé, une solution de concentration calcique faible contenant 10 mM de TEA est amenée dans la cuve expérimentale. Une contraction plus faible (132 mg) se développe avec un temps de mise sous tension maximale comparable à celui observé en absence de TEA, puisqu'il est égal à 53 sec.

Le TEA diminue donc faiblement l'amplitude du largage calcique induit par le mécanisme de "Ca-induced Ca release".

Afin de déterminer si le TEA modifie la valeur de la plus petite concentration calcique capable d'induire un largage calcique à partir du RS, une expérience comparable à celle rapportée à la figure 44 a été effectuée. Après la charge calcique du RS, des solutions de concentration calcique faible contenant du TEA (10 mM) et des concentrations variées d'EGTA (5, 7.5 et 10 μM d'EGTA) ont été appliquées. On observe, quand la concentration d'EGTA augmente, une diminution de la contraction associée à une augmentation de la latence (L) et du temps de mise sous tension maximale (t). Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau ci-dessous.

EGTA μM	T _{mg}	L _{sec}	t _{sec}	L + t _{sec}
0	132	0	53	53
5	97.4	122	144	266
7.5	37.5	175	228	403
10	0	-	-	-

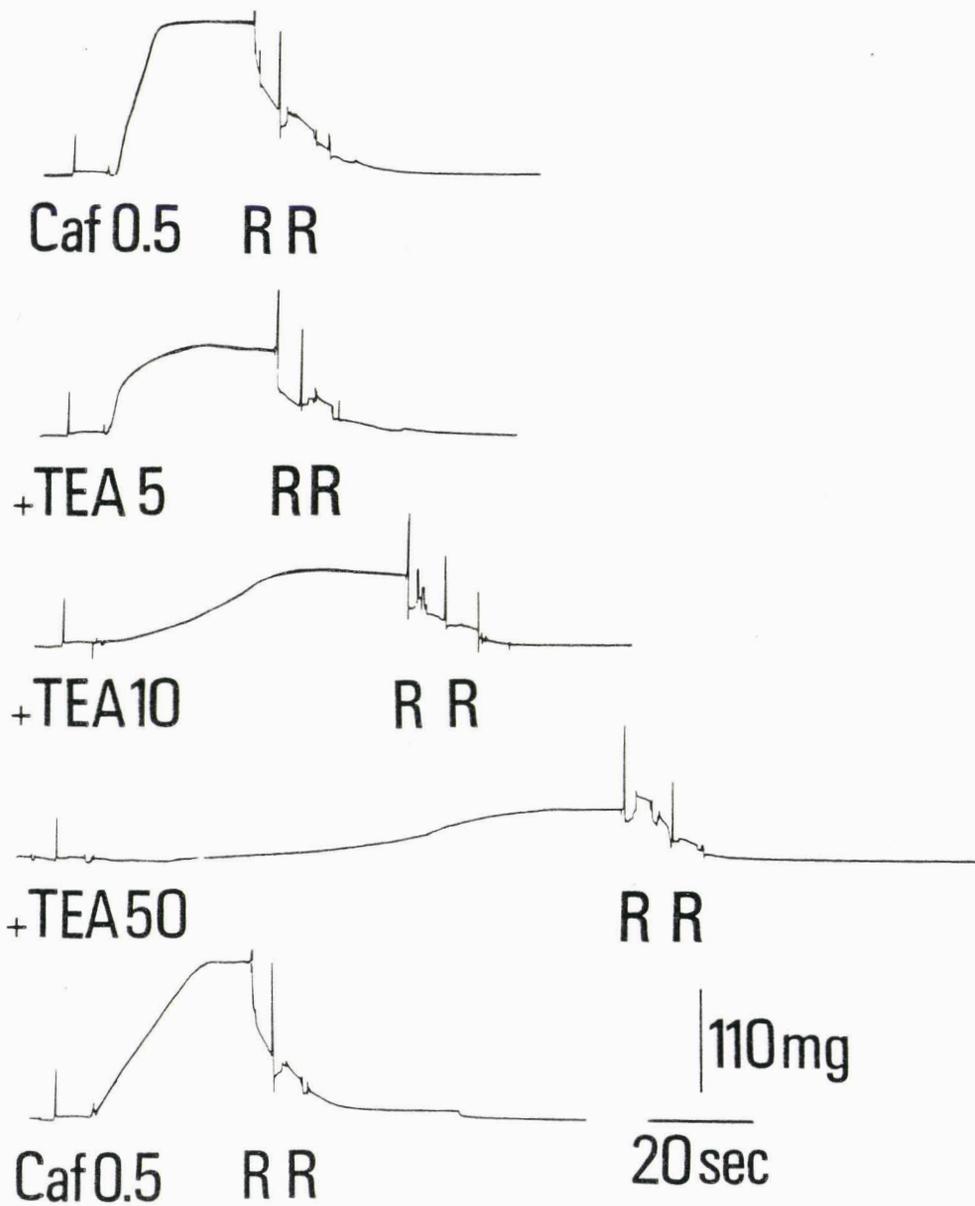


Figure 67 : Influence de la dose de TEA sur le mécanisme de "Ca-induced Ca release". Contractions induites par une solution de concentration calcique faible additionnée de caféine 0.5 mM sans (Caf 0.5) et avec 5 mM (+ TEA 5) 10 mM (+ TEA 10) et 50 mM (+ TEA 50) de tétraéthylammonium, après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 min, non illustré sur la figure). Les contractions sont relâchées par plusieurs applications de la solution relaxante, R.

Fibre n° 201282.

Il s'en suit donc que la plus petite concentration calcique permettant un largage calcique à partir du RS a une valeur comprise entre celle de la solution contenant 7.5 μM d'EGTA et celle de la solution contenant 10 μM d'EGTA. Ce résultat est identique à celui obtenu en absence de TEA (voir Fig. 44). Cependant, la mesure de la concentration en calcium libre dans la solution contenant du TEA, effectuée à l'aide d'une électrode sensible au calcium a montré qu'elle était supérieure à celle obtenue en absence de TEA puisqu'elle est égale à $3.98 \cdot 10^{-7}$ M contre $1.25 \cdot 10^{-7}$ M en absence de TEA. Connaissant cette valeur ainsi que celle de la constante d'association du calcium pour l'EGTA ($1.919 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$) on sait après calcul que la solution contenant 7.5 μM EGTA a une concentration en calcium libre égale à $2.71 \cdot 10^{-8}$ M et celle contenant 10 μM d'EGTA, une activité calcique de $2.04 \cdot 10^{-8}$ M. En conclusion, en présence de 10 mM TEA, la plus petite concentration calcique permettant le largage de calcium est comprise entre $2.04 \cdot 10^{-8}$ M et $2.71 \cdot 10^{-8}$ M.

A l'issue des expériences exposées ci-dessus, nous pouvons conclure que le TEA, à une concentration de 10 mM, diminue légèrement le largage calcique dû au mécanisme de "Ca-induced Ca release" et augmente la valeur seuil de la concentration calcique déclenchant ce mécanisme.

b - Influence de la dose de TEA sur l'inhibition du mécanisme de "Ca-induced Ca release"

La fragilité de notre préparation biologique est telle qu'elle supporte mal le développement lent de contractions. C'est pourquoi, nous

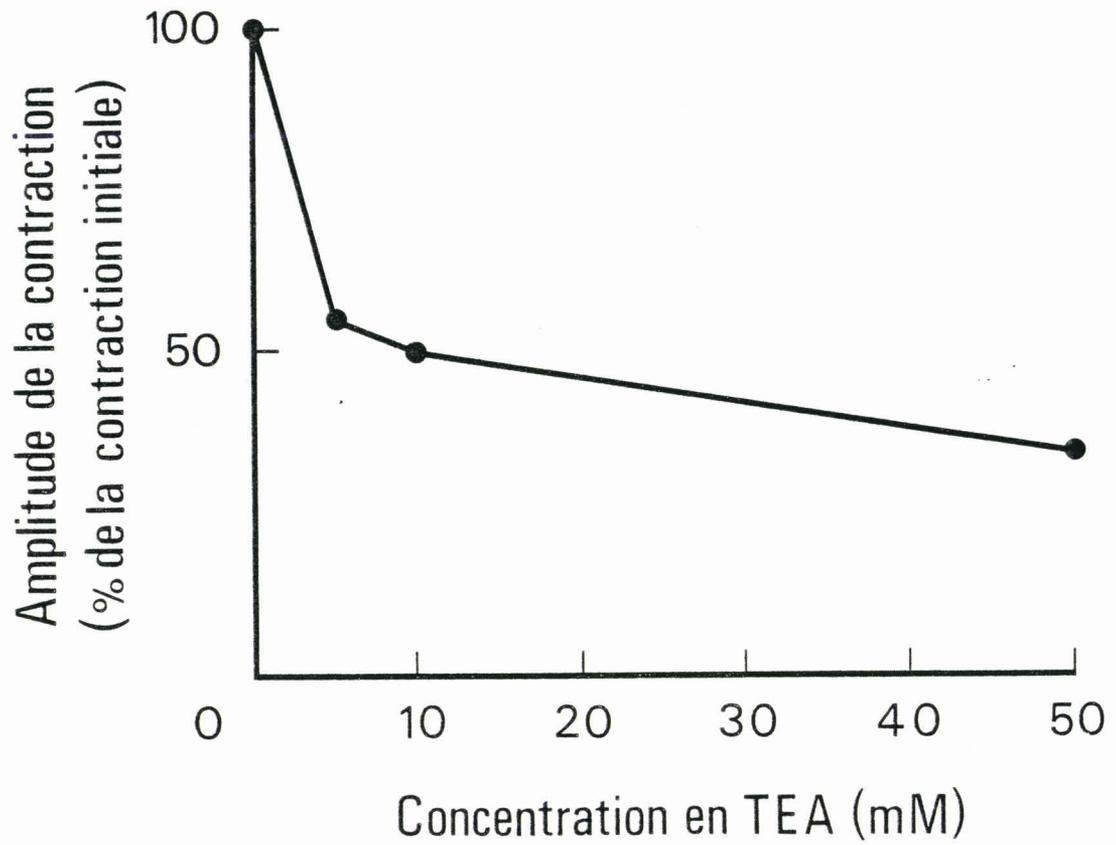


Figure 68 : Evolution de la contraction en fonction de la concentration en TEA.

Même fibre qu'à la figure 67.

avons testé l'effet de concentrations variées de TEA sur le mécanisme de "Ca-induced Ca release" dans des conditions telles qu'il soit accéléré c'est-à-dire sur des contractions dues à une solution de concentration calcique faible additionnée de 0.5 mM de caféine. En effet, nous savons que dans ces conditions le largage calcique est accéléré et par voie de conséquence la contraction est plus rapide (voir Fig. 45). L'expérience est illustrée à la figure 67.

Après charge calcique maximale du RS (pCa 6.6, 5 min) une solution de concentration calcique faible contenant 0.5 mM de caféine sans ou avec 5, 10 et 50 mM TEA a été appliquée. On observe que plus la concentration de TEA est élevée plus l'amplitude de la contraction diminue et plus sa cinétique de développement est ralentie. Les amplitudes de ces contractions sont égales à 159.50, 88.00, 79.75 et 55.00 mg pour 0, 5, 10 et 50 mM TEA respectivement. Ces modifications sont bien dues à un effet du TEA et non à une fatigue de la fibre puisque la sollicitation d'une contraction due à la solution caféinique 0.5 mM, effectuée en fin d'expérience, induit une contraction d'amplitude et de cinétique comparable à la contraction initiale. Ses caractéristiques sont les suivantes : amplitude, 163 mg ; latence, 7 sec ; temps de mise sous tension maximale (latence incluse), 29 sec. Les amplitudes des contractions obtenues exprimées en pour cent de la contraction initiale sont reportées en fonction de la concentration en TEA (Fig. 68). Les contractions sont égales à 55.17 %, 50.00 % et 34.48 % de la contraction initiale pour 5, 10 et 50 mM TEA respectivement.

D - Conclusion

Le tétraéthylammonium, ammonium quaternaire couramment utilisé pour inhiber les courants potassiques se développant au niveau de la membrane sarcolemmique, a une action sur les composants subcellulaires : les protéines contractiles et le réticulum sarcoplasmique.

Au niveau des protéines contractiles : le TEA

- diminue la sensibilité calcique des protéines contractiles et l'affinité des sites de la troponine. Il diminuerait aussi le nombre de sites calciques impliqués dans la contraction ;

- ne modifie pas l'amplitude de la contraction maximale que la fibre est capable de développer ;

- diminue la vitesse de développement de l'activité mécanique.

Au niveau du réticulum sarcoplasmique : le TEA

- diminue la capacité de largage de la membrane ;

- diminue la vitesse de pompage de l'ATPase calcique ;

- diminue le largage calcique de type "Ca-induced Ca release"

ainsi que la sensibilité calcique de ce mécanisme. L'inhibition de ce largage est dépendante de la dose de TEA.

II - LA 4-AMINOPYRIDINE

A - Courants ioniques membranaires et activité mécanique en présence de 4-aminopyridine

Sur une fibre ne présentant pas de courant sortant retardé I_{K_2} , pour une dépolarisation imposée d'amplitude 58 mV et de durée 100 msec, le courant sortant initial, I_{K_1} , très ample en milieu ASW, est totalement inhibé après 10 à 20 minutes d'action de la 4AP à une concentration de 1 mM (Fig. 69). Le courant entrant calcique est très fortement augmenté (environ 10 fois sur l'enregistrement de la Fig. 69).

L'enregistrement sur une autre fibre de la composante de tension phasique induite par une dépolarisation imposée de 60 mV et de durée 40 msec en milieu ASW puis en présence de 4AP (1 mM) est illustré à la figure 70. On observe que l'amplitude de la contraction augmente après 3 minutes d'action de la 4AP puisque son amplitude passe de 112 mg à 136 mg puis diminue pour atteindre une valeur inférieure à la contraction témoin dès 10 minutes d'action. La chute de contraction se poursuit jusqu'à 16 minutes. L'évolution ultérieure de cette tension n'a pas été testée sur cette fibre. Cependant, une expérience identique effectuée sur 3 autres fibres montre qu'au delà de 15 à 16 minutes d'action de la 4AP (1 mM) la contraction phasique est annulée. De plus, l'expérience illustrée à la figure 70 montre que l'effet de la 4AP 1 mM est réversible puisque après 11 minutes de retour en milieu normal, la tension a une amplitude comparable à la tension témoin.

Donc, contrairement à ce qui est observé en présence de TEA, la contraction ne demeure pas augmentée bien que le courant calcique reste de grande amplitude.

Afin de comprendre la nature du découplage entre l'amplitude du courant calcique et l'amplitude de la tension phasique, des expériences

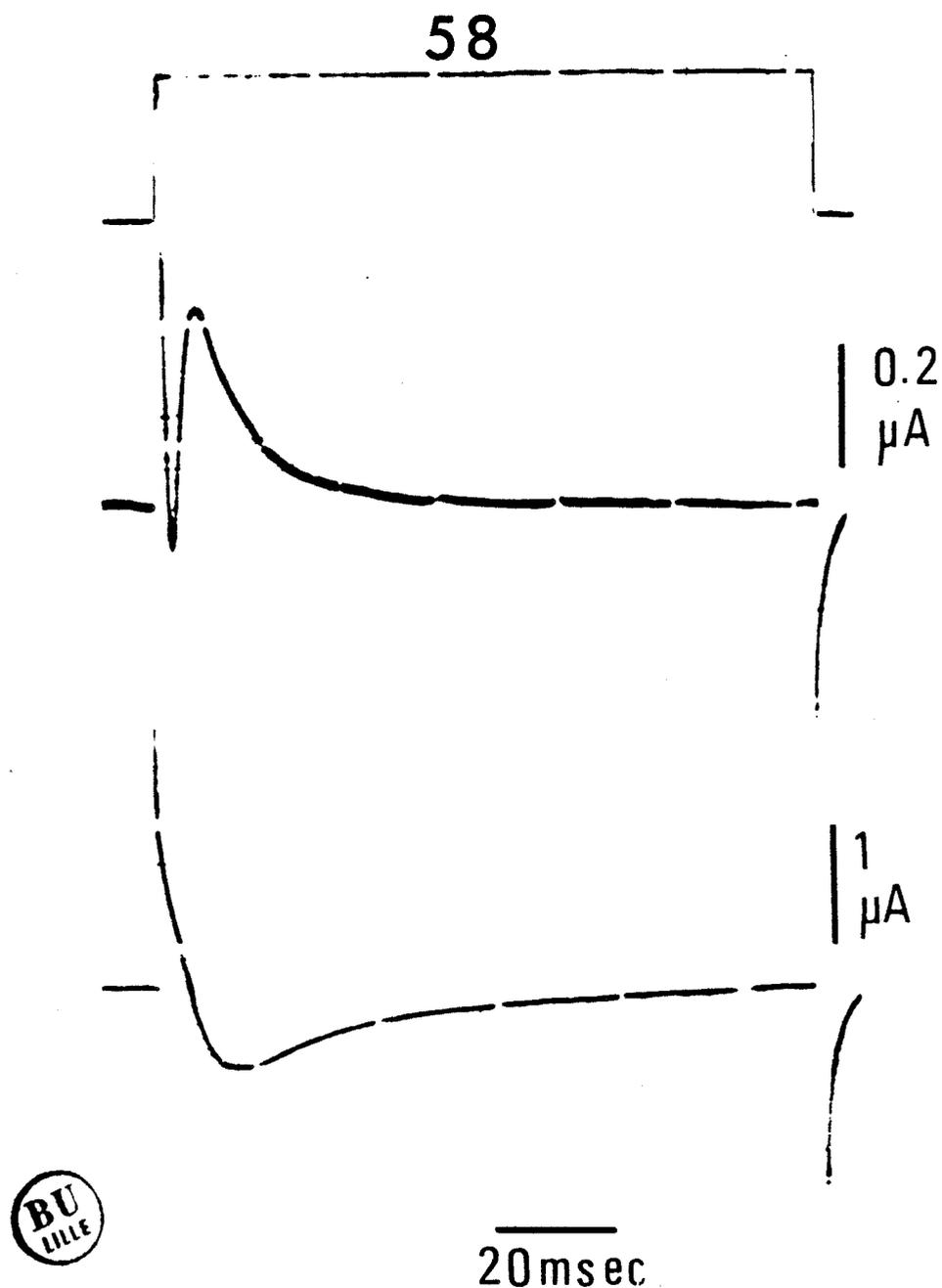


Figure 69 : Comparaison des courants ioniques (I) pour une dépolarisation imposée (V) de 58 mV et d'une durée 100 msec.

En haut : en solution physiologique normale (ASW)

En bas : en présence de 4AP 1 mM.

Notez la diminution de sensibilité de l'enregistrement situé en bas.

Fibre n° 230980.

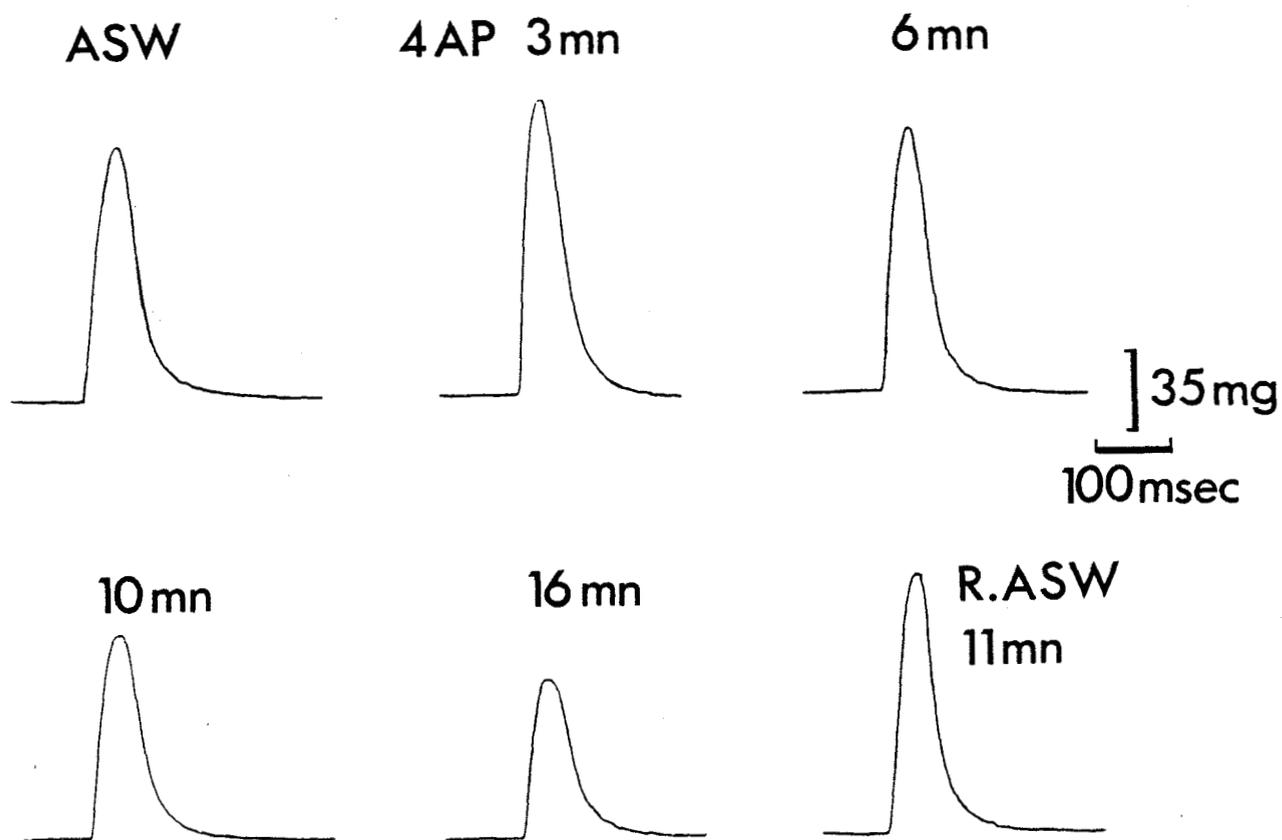


Figure 70 : Evolution de la contraction induite par une dépolarisation membranaire de 60 mV et de durée 40 msec lors de l'application d'une solution 4AP 1 mM et lors du retour en milieu physiologique normale (ASW).

En haut : de gauche à droite, en milieu ASW puis après 3 et 6 mn d'action de la 4AP 1 mM.

En bas : de gauche à droite après 10 et 16 mn d'action de la 4AP 1 mM puis après 11 mn de retour en milieu ASW (R. ASW).

Fibre n° 280982.

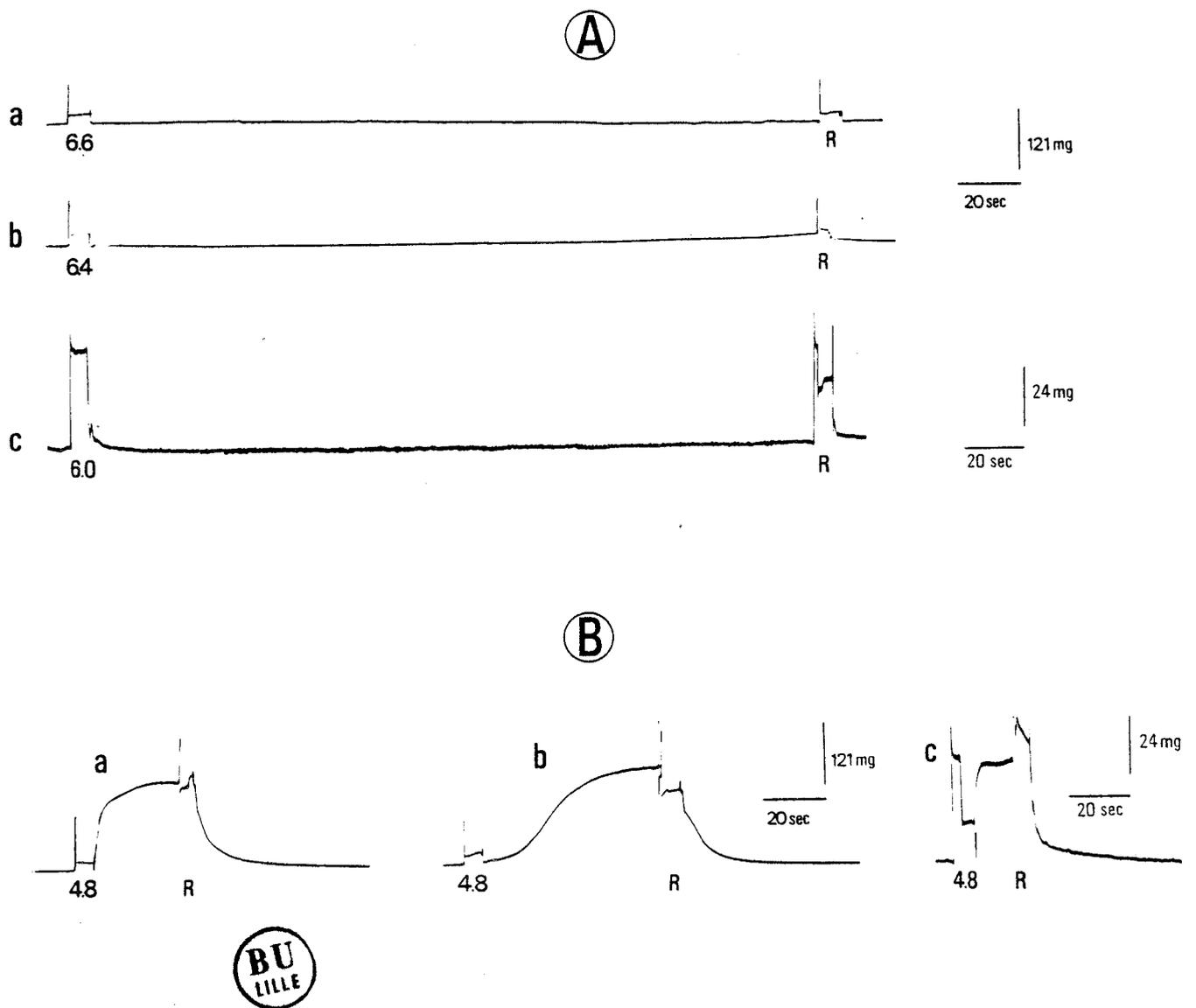


Figure 71 : Influence de la 4AP 1 mM sur les protéines contractiles.

A : valeur seuil de déclenchement de la contraction calcique : en milieu physiologique normal (a), après 1 min (b) et 5 min (c) d'action de la 4AP 1 mM.

B : évolution de la contraction maximale induite par une solution pCa 4.8 en milieu physiologique normal (a) et après 1 min (b) et 5 min (c) d'action de la 4AP 1 mM.

Notez l'augmentation de sensibilité pour les enregistrements c.

R indique l'application de la solution relaxante.

Fibre n° 160484.

ont été effectuées en présence de 4 AP 1 mM sur des fibres musculaires pelées afin de tester les effets de cette drogue sur les acteurs de la contraction : les protéines contractiles.

B - 4-aminopyridine et protéines contractiles

L'application de solutions de pCa variées en absence puis en présence de 4-AP (1 mM) après 1 et 6 minutes d'action induit des modifications des contractions qui se développent.

1. Analyse des enregistrements

La figure 71 (A et B) représente les enregistrements obtenus pour deux pCa dans les conditions normales (tracés a) puis en présence de 4AP (1 mM) après 1 minute (tracés b) et 5 minutes d'action (tracés c). On observe que la valeur seuil de pCa est modifiée par la présence de la 4AP (1 mM) et de façon différenciée en fonction du temps d'application : la valeur seuil est égale à pCa 6.6 en absence de 4AP (Fig. 71A, tracé a), à pCa 6.4 après 1 minute d'action de la 4AP (Fig. 71A, tracé b) et à pCa 6.0 après 5 minutes d'action de la drogue (Fig. 71A, tracé c). Le seuil d'activation calcique des protéines contractiles est donc déplacé vers les pCa plus faibles sous l'action de la 4AP et ceci de façon d'autant plus importante que le temps d'action est long.

L'analyse des contractions maximales induites par une solution pCa 4.8 additionnée ou non de 4AP montre une action différente de cette

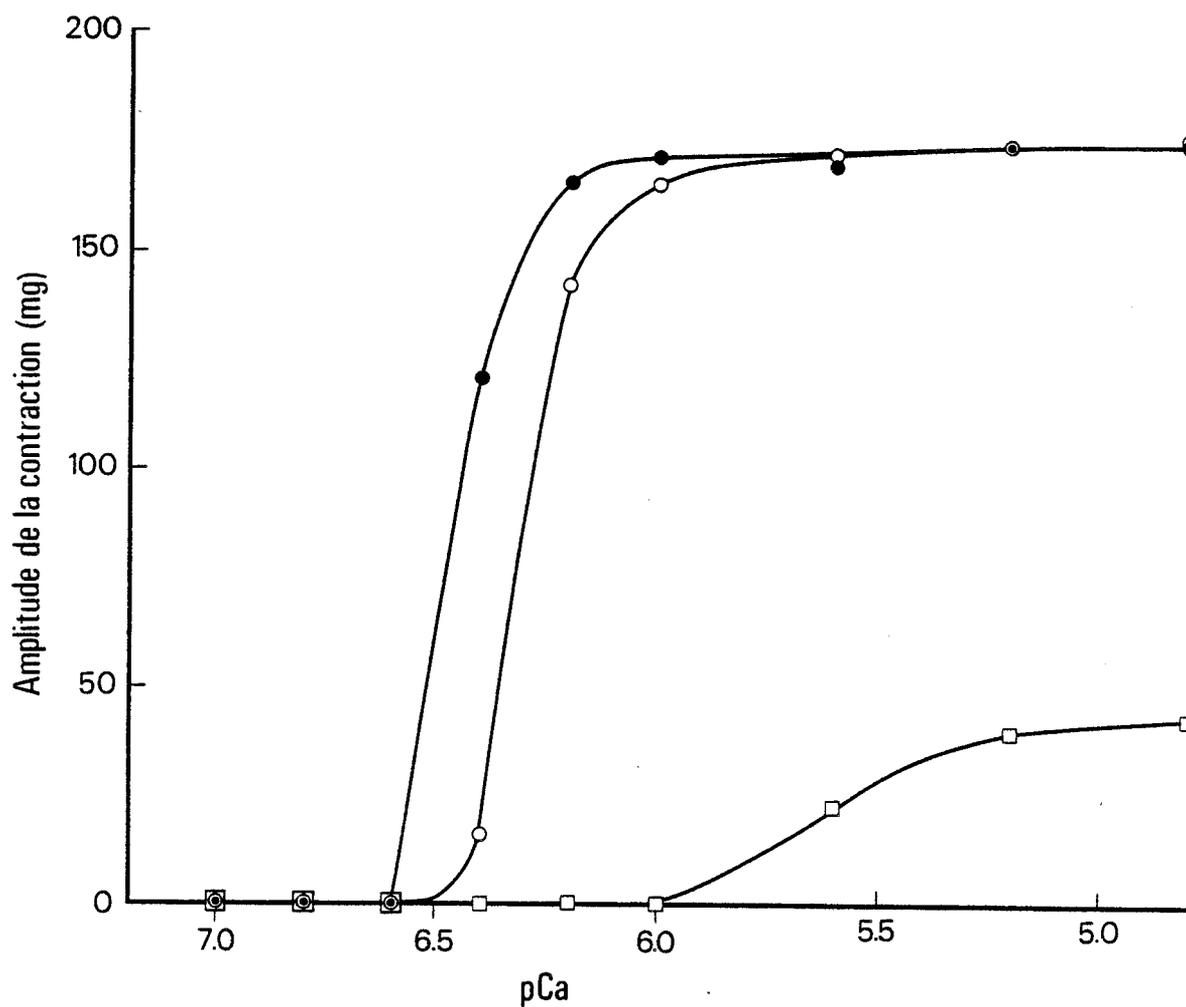


Figure 72 : Evolution de la contraction (ordonnée) en fonction de pCa (abscisse) en conditions physiologiques normales (●), après 1 min (○) et 5 min (□) d'action de la 4AP 1 mM.

Même fibre qu'à la figure 71.

drogue selon son temps d'action (Fig. 71B). Après une minute d'action (Fig. 71B, tracé b), l'amplitude de la contraction n'est pas affectée mais le temps de mise sous tension maximale est très nettement diminué (comparer les tracés a et b). Ils sont respectivement égaux à 19 sec et 52 sec en absence puis en présence de 4AP. Après 5 minutes d'action (Fig. 71B, tracé c), on observe une diminution très importante de la contraction maximale puisqu'elle est égale à 39 mg. Le temps de montée ne semble pas affecté.

2. Relation tension-pCa

Le report des amplitudes des contractions induites pour un nombre de pCa plus important que celui représenté à la figure 71, a été effectué dans les trois conditions expérimentales citées ci-dessus. Les courbes tension-pCa obtenues sont illustrées à la figure 72. Outre les résultats déjà présentés dans la figure précédente, c'est-à-dire le déplacement du seuil vers les pCa plus faibles et la diminution de l'amplitude de la contraction maximale après 5 minutes d'action de la 4AP plusieurs observations peuvent être décrites :

- après 1 minute d'action la 4AP induit un déplacement général de la courbe tension-pCa de 0.16 unité pCa vers les pCa les plus faibles avec une légère modification de la pente.

- après 5 minutes d'action la 4AP induit un déplacement beaucoup plus important de la courbe vers les pCa plus faibles ainsi qu'une diminution très importante de la pente.

En conclusion, après 1 minute d'action, la sensibilité des protéines contractiles au calcium est diminuée, l'affinité de la troponine pour le calcium est aussi diminuée puisque les valeurs de pCa_{50} sont respectivement égales à 6.47 et 6.26 en absence puis en présence de 4AP. Le nombre de sites calciques impliqués dans le développement de la contraction est diminué, puisque les coefficients de Hill (n_H) sont respectivement égaux à 4.86 et 3.56, à moins que leur coopérativité n'ait été modifiée. La force maximale est inchangée. La diminution du temps de mise sous tension maximale pour une contraction d'amplitude inchangée laisse supposer une diminution de la vitesse du cycle attachement - détachement des ponts entre l'actine et la myosine.

Après 5 minutes d'action, la sensibilité des protéines contractiles est diminuée de façon encore plus importante ainsi que l'affinité calcique de la troponine puisque la valeur de pCa_{50} est respectivement égale à 6.47 et 5.62 en absence de 4AP et après 5 minutes de son action. Le nombre de sites calciques impliqués dans la contraction est très nettement diminué et/ou leur coopérativité est modifiée. En effet, les coefficients de Hill sont égaux à 4.86 (sans 4AP) et 2.72 (4AP, 5 min). La contraction maximale est très nettement diminuée.

C - Conclusion

L'analyse des résultats illustrés de la figure 69 à 72 permet de comprendre le découplage, observé sur les fibres intactes, entre le courant entrant calcique et le développement de l'activité mécanique. L'augmentation de tension, observée après 3 minutes d'action de la 4AP, semble être la ré-

sultante de l'augmentation du courant entrant calcique et de la diminution de contraction observée dès 1 minute d'action de la 4AP sur les fibres pelées. Notons ici qu'il est connu qu'une contraction musculaire sur fibre intacte n'atteint jamais l'amplitude d'une contraction maximale sur fibre pelée. Il ne faut donc pas pour l'interprétation des phénomènes contractiles enregistrés sur fibre intacte, tenir compte des résultats obtenus sur la contraction maximale des fibres pelées. Les diminutions ultérieures sont la conséquence d'un effet de plus en plus drastique de la 4AP sur la machinerie contractile. La quantité de calcium entrant via I_{Ca} et son amplification par le mécanisme de "Ca-induced Ca release" ne sont plus suffisantes pour contrebalancer les effets propres de la 4AP sur les protéines contractiles.

DISCUSSION

La problématique abordée dans le cadre de ce travail a été axée essentiellement sur la détermination du mécanisme de libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Pour effectuer cette étude, trois techniques ont été utilisées :

- une technique électrophysiologique d'enregistrement simultané des courants ioniques membranaires et de la contraction.

- une technique d'enregistrement de contraction sur fibre pelée permettant, en fonction du protocole utilisé, d'évaluer le largage calcique par l'amplitude et la cinétique de la contraction consécutive à l'augmentation de la concentration calcique intramusculaire, et aussi de déterminer directement les propriétés des protéines contractiles dans des milieux physiologiques variés et bien que de façon plus indirecte, l'activité de l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique.

- une technique photométrique permettant une détermination plus directe et quantitative du largage calcique sur les fibres pelées : la technique de l'arsenazo III.

De plus, l'utilisation d'inhibiteurs potassiques dans l'étude du couplage excitation-contraction par l'enregistrement simultané des courants ioniques membranaires et de la contraction nous a amené à tester les effets possibles de ces inhibiteurs sur les acteurs subcellulaires du couplage et de la contraction : le réticulum sarcoplasmique et les protéines contractiles.

Dans le cadre de ce chapitre nous aborderons donc les points à discuter non pas dans l'ordre de l'exposé des résultats mais au sein de 3 thèmes qui seront :

- le largage calcique par le réticulum sarcoplasmique
- l'activité de l'ATPase calcique du RS
- les propriétés des protéines contractiles.

LE LARGAGE CALCIQUE PAR LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE

I - MECANISME DE CALCIUM-INDUCED CALCIUM RELEASE

L'amplitude de la contracture caféinique obtenue sur fibre intacte (Fig. 29) est comparable à celle observée sur les fibres musculaires intactes d'Ecrevisse par CHIARANDINI et coll. (1970). En effet ces auteurs enregistrent des contractions d'amplitude voisine de 170 mg pour une concentration caféinique égale à 5 mM alors que dans nos conditions (6 mM) la moyenne obtenue sur 4 fibres est égale à 164.83 +/- 6.33 mg. La diminution importante de la contracture caféinique obtenue en milieu dépourvu de calcium laisse supposer un effet synergique du calcium et de la caféine. Cet effet pourrait être la conséquence d'une augmentation de la perméabilité calcique de repos par la caféine ainsi que cela a été décrit sur les fibres musculaires de Vertébrés (BIANCHI, 1961) et suggéré par CHIARANDINI et coll. (1970) sur les fibres musculaires d'Ecrevisse (voir Historique).

Cette augmentation de la conductance calcique de repos serait comparable à l'entrée de calcium permanente au repos observée en présence de ryanodine (GOBLET et MOUNIER, 1981), alcaloïde comparable à la caféine. L'absence de dépolarisation observée, en accord avec les résultats de AXELSON et THESLEFF (1958), LUTTGAW et OETLIKER (1968) et CHIARANDINI et coll. (1970), bien que le flux entrant soit augmenté suggère qu'un système contribue à éviter que $[Ca]_i$ n'atteigne l'équilibre avec $[Ca]_e$.

Le mécanisme de Na-Ca échange pourrait être ce système. Cette interprétation est d'autant plus vraisemblable que nous avons vu dans le chapitre "Historique" qu'un mécanisme de Na-Ca échange existe sur les fibres musculaires de Crabe.

Les expériences préliminaires effectuées sur fibre intacte laisse donc supposer l'existence d'un mécanisme de "Ca-induced Ca release" sur notre matériel biologique.

Le résultat le plus important concernant le largage calcique est qu'une très petite concentration en calcium libre insuffisante pour activer directement les protéines contractiles peut induire un largage calcique à partir du réticulum sarcoplasmique (voir Fig. 43). Un mécanisme de "Ca-induced Ca release" a donc été démontré sur la fibre musculaire de Crabe et la plus petite valeur de Ca^{++} permettant le déclenchement de ce mécanisme est située entre 8.25×10^{-9} et 1.08×10^{-9} M (voir Fig. 44).

Les valeurs rapportées dans la littérature ne se situent pas dans cette gamme de concentration. En effet, la plus petite valeur rapportée, l'a été sur l'atrium de rat et demeure cependant supérieure à ce que nous avons obtenu puisqu'elle est égale à 3×10^{-8} M (FABIATO et FABIATO, 1978 b). Deux facteurs peuvent modifier la plus petite concentration calcique permettant le largage calcique : i) le temps nécessaire au changement de solution, ii) l'espèce animale étudiée. D'après FABIATO (1982), quand le changement de solution est effectué en 0.2 sec, le mécanisme de

"Ca-induced Ca release" est déclenché par une concentration en calcium libre plus basse que ce qui est nécessaire pour activer les protéines contractiles. Quand le changement de solution est effectué en 10 sec, la concentration calcique nécessaire pour déclencher le largage calcique est très nettement augmentée. Dans nos conditions expérimentales, le temps nécessaire pour changer la solution est relativement lent puisqu'il est égal à 1.0 sec. Cependant, même dans ces conditions, qui ne sont pas les plus favorables pour démontrer l'existence d'un mécanisme de "Ca-induced Ca release", nous avons pu déterminer une concentration en calcium libre déclenchant ce mécanisme, inférieure au seuil d'activation des protéines contractiles. Il s'en suit donc que cette faible valeur de concentration en calcium libre nécessaire pour larguer le calcium, différente de celle obtenue par FABIATO et FABIATO (1978b) sur l'atrium de rat, ne peut être due à la différence du temps de changement de solution. Ce peut donc être dû aux variations entre espèces rapportées par FABIATO et FABIATO (1978b). En effet, d'après ces auteurs, la plus petite concentration calcique permettant le largage calcique augmente au sein des tissus ventriculaires de différentes espèces de mammifères dans l'ordre suivant : rat, chien et chat, homme, lapin. Cette valeur varie de 4×10^{-8} à 1.5×10^{-7} M.

Cette explication nous semble d'autant plus probable qu'une expérience semblable à celle illustrée à la figure 44 a été effectuée au laboratoire sur les fibres musculaires des muscles biceps femoris de Singe et grand fessier humain. On observe que la valeur seuil de la concentration en calcium libre permettant le largage calcique est comprise entre 1.20×10^{-8} M et 2.88×10^{-8} M pour le muscle biceps femoris et comprise entre 2.69×10^{-8} M

et 3.48×10^{-8} M pour le muscle grand fessier humain. La concentration calcique seuil permettant le largage calcique varie donc bien d'une espèce à l'autre. Nos expériences effectuées sur des muscles striés montrent une sensibilité calcique du mécanisme de "Ca-induced Ca release" dans l'ordre croissant suivant : grand fessier humain, biceps femoris de Singe et muscle extenseur du méropodite de Crabe.

Les contractions illustrées aux figures 43, 44 et 45 sont très lentes. Indépendamment du fait selon lequel les cinétiques des contractions observées sur les fibres pelées sont toujours plus lentes que celles observées sur les fibres intactes, la lenteur importante observée peut être la conséquence d'un temps très important de diffusion radiale dans l'ensemble de la fibre des ions Ca largués à cause du diamètre très important des fibres musculaires de Crabe. D'après l'équation de CRANCK (1975) rapportée par FABIATO (1985 a), dans une préparation cylindrique, le temps nécessaire pour que la concentration moyenne en calcium libre atteigne 90 % de sa valeur d'équilibre après une modification de la concentration calcique à la surface externe de la fibre, est égal à $0.1 r^2/D'$. Dans cette équation, r représente le rayon de la fibre et D' le coefficient apparent de diffusion des ions Ca égal à $1.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (KUSHMERICK et PODOLSKY, 1969). A partir de cette équation et connaissant la valeur moyenne du diamètre des fibres musculaires de Crabe (255.89 ± 20.33 , $n = 17$), le temps permettant d'atteindre 90 % de l'équilibre est égal à 117.2 sec. La valeur moyenne de la latence + le temps de mise sous tension maximale observée pour des contractions induites par la solution de concentration calcique faible est égale à 250.09 ± 17.58 sec ($n = 5$). Cette valeur plus importante que le calcul théorique peut être due, comme cela a été

souligné par FABIATO (1985 a), à un coefficient réel de diffusion plus faible à cause de l'existence de sites de fixation calcique dans les myofilaments.

Le développement d'une contraction proche de P_0 (voir Fig. 43) due au largage calcique induit par une solution de concentration calcique faible comprise entre 1.6×10^{-7} M et 1.25×10^{-7} M alors qu'une solution de concentration calcique supérieure ($pCa\ 6.6 = 3 \times 10^{-7}$ M) n'induit pas de largage, nécessite discussion. L'une des interprétations possibles est la suivante : la présence de 5 mM d'EGTA dans la solution $pCa\ 6.6$ nécessiterait le largage de 5 mM de calcium pour obtenir un accroissement calcique tel qu'une contraction proche de P_0 se développe. Or les résultats obtenus à l'aide de l'arsenazo (voir Fig. 48 et Fig. 62) montrent que le largage maximal induit par une solution caféinique de concentration 20 mM est compris entre 216.49 μ M et 283.21 μ M. Il est donc possible que sous l'influence d'une solution $pCa\ 6.6$, du calcium soit largué par le RS mais si cela est le cas, il est immédiatement tamponné par l'EGTA présent dans la solution ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle des sites calciques de la troponine (voir Historique). Notons que c'est la raison pour laquelle les auteurs qui évaluent le largage calcique par la tension développée par une fibre pelée utilisent des solutions calciques non tamponnées (FORD et PODOLSKY, 1972) ou faiblement tamponnées (FABIATO et FABIATO, 1978 b). La sensibilité du largage calcique à l'EGTA est importante puisqu'une augmentation de la concentration en EGTA de 5×10^{-5} M à 10^{-4} M en maintenant la concentration en calcium libre constante, conduit à une réduction importante du largage calcique (FABIATO et FABIATO, 1978 b).

L'expérience illustrée à la figure 44 montre que le mécanisme de "Ca-induced Ca release" est un mécanisme gradué plutôt que de type tout ou rien comme cela a été rapporté sur les cellules cardiaques pelées par FABIATO et FABIATO (1975 a). Il dépend donc comme nous l'avons montré de la concentration calcique extraréticulaire en accord avec les travaux de NAGASAKI et KASAI (1984) sur les vésicules isolées du réticulum sarcoplasmique. De plus, l'expérience illustrée à la figure 45 montre que la vitesse du "calcium-induced calcium release" est stimulée par la caféine en accord avec des rapports précédents (ENDO, 1977 ; MILLER et THIELECZEK, 1977 ; MARTONOSI, 1984).

Nous avons rapporté dans le paragraphe "Solutions" du chapitre "Matériel et Méthodes" que la concentration en magnésium libre est égale à 4.53×10^{-4} M (pMg = 3.34) dans la solution de concentration calcique faible. A cette concentration en magnésium libre, le mécanisme de largage devrait être inhibé puisque FORD et PODOLSKY (1972) ont montré qu'une augmentation de la concentration en magnésium de 0.02 mM à 1.4 mM inhibe très fortement la force due au mécanisme de "Ca-induced Ca release" sur les fibres pelées de grenouille. L'observation, sur notre préparation de l'existence de ce mécanisme en présence de 0.45 mM de Mg libre pourrait être due au fait que les niveaux physiologiques en Mg sur les fibres musculaires

de Crustacés sont plus élevés que sur les fibres musculaires squelettiques de Vertébrés. En effet, sur la balane, *Balanus nubilus*, la concentration totale en Mg varie de 17.0 mM (SHAW, 1958) à 10.8 mM (BITTAR, 1971) et la concentration en Mg libre est inférieure à 5 mM (ASHLEY et ELLORY, 1972). Sur la fibre musculaire de grenouille, la concentration totale en Mg varie entre 8 mM (BIANCHI, 1968) et 11.3 mM (NANNINGA, 1961) et la concentration en Mg libre est égale selon les auteurs à 0.9 mM (ENDO, 1977) ou 0.8 mM (ALVAREZ-LEEFMANS et coll., 1985). Ceci pourrait également être dû au fait que le mécanisme de "Ca-induced Ca release" est un processus physiologique sur notre préparation et non pas sur les fibres musculaires squelettiques. Ceci a été l'explication donnée par FABIATO et FABIATO (1975b) pour expliquer l'existence de ce mécanisme de largage sur le muscle cardiaque même en présence d'une pMg égale à 2.5 ($Mg^{++} = 3.16$ mM) dans une préparation où la Mg^{++} est similaire à celle du muscle squelettique (PAGE et POLIMENI, 1972).

La signification physiologique du mécanisme de "Ca - induced Ca release" est renforcée par les résultats de KIM et coll. (1983) qui, sur des vésicules isolées du RS de muscle squelettique, montrent que des canaux calciques de cinétique identique sont responsables du largage calcique quelle que soit la méthode employée pour l'initier. De plus, ce largage in vitro est comparable en rapidité au largage physiologique. Récemment,

le même groupe (IKEMOTO et coll., 1984), a mis au point une technique permettant d'associer ou de dissocier le système tubulaire transverse aux vésicules isolées du RS. Leurs résultats permettent de déterminer le rôle du système tubulaire transverse dans les divers types de largage calcique. En effet, l'association du tubule T au RS joue un rôle primordial dans le déclenchement d'un largage calcique par substitution ionique. Par contre, le mécanisme de "Ca - induced Ca release" ou "caféine - induced Ca release" n'est pas affecté par la dissociation du tubule T et existerait donc par stimulation directe de la membrane du RS.

II - MECANISME DE STRONTIUM-INDUCED CALCIUM RELEASE

L'existence d'un largage calcique induit par les ions strontium a antérieurement été rapporté sur les fibres musculaires pelées de Grenouille (ENDO et coll., 1970), de Crabe et de Balane (STEPHENSON et WILLIAMS, 1980). Un rapport plus récent conclut également sur les fibres musculaires intactes de Grenouille à l'existence d'un tel mécanisme (COGNARD et RAYMOND, 1985). La particularité de notre résultat a été de montrer la complexité de la contraction induite par 0.02 mM ou 0.1 mM Sr

après charge calcique maximale du RS. En effet, la réponse a pu être divisée en deux composantes : des tensions phasiques se développant au hasard sur une tension tonique. Les tensions phasiques et 90 % de la tension tonique sont dues au mécanisme de "strontium-induced calcium release". La concentration seuil en strontium déclenchant ce mécanisme est proche de 2×10^{-5} M alors que la concentration seuil en calcium est comprise entre 8.25×10^{-9} M et 1.08×10^{-9} M. Il y a donc une sensibilité du mécanisme de largage très nettement inférieure aux ions Sr qu'aux ions Ca.

L'existence de ce mécanisme de "Sr-induced Ca release" est un résultat en faveur de l'existence d'un mécanisme de "Ca-induced Ca release". En effet, dans tous les mécanismes du couplage excitation-contraction qui avec certitude nécessite la présence d'ions calcium, il est connu que les ions Sr peuvent s'y substituer. C'est notamment le cas pour le canal calcique des fibres de Crustacés (FATT et GINSBORG, 1958 ; HAGIWARA et NAKA, 1964 ; MOUNIER et VASSORT, 1975 a ; HENČEK et ZACHAR, 1977), la fixation calcique sur la troponine C, l'activation de l'actomyosine ATPase ainsi que de l'ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (NAGAI et coll., 1965) du muscle de Homard (VAN DER KLOOT et GLOVSKY, 1965) et du muscle lisse (SOMLYO et SOMLYO, 1971). La différence d'efficacité des ions Sr et Ca est très souvent rapportée. En effet l'affinité du canal calcique tubulaire des fibres de Balane est supérieure pour le calcium que pour le strontium (HAGIWARA et coll., 1974) ; la constante d'association du strontium pour les sites de la troponine est inférieure à celle du calcium (EBASHI et coll., 1968) ; l'obtention d'une activité ATPasique maximale de la myosine

nécessite une concentration en ions Sr supérieure à la concentration en ions Ca (EDWARDS et coll., 1966 ; EBASHI et coll., 1968) ; enfin, le réticulum sarcoplasmique capte de façon moins efficace les ions Sr que les ions Ca (VAN DER KLOOT et GLOVSKY, 1965 ; TOMKAVA' et KONTSEKOVA, 1980 ; SCHUURMANS-STEKHOVEN et BONTING 1981). Cependant, GOGNARD et RAYMOND (1985) ont récemment rapporté l'existence d'une affinité des ions Sr supérieure à celle des ions Ca pour des sites intraréticulaires.

En conclusion, dans tous les mécanismes du couplage excitation-contraction, le strontium se substitue au calcium. L'existence du "Sr-induced Ca release" vient donc renforcer l'idée de l'existence du mécanisme de "Ca-induced Ca release" ayant une signification physiologique. Cette idée est renforcée par les résultats de NAGASAKI et KASAI (1984) qui ont montré sur des vésicules isolées du RS l'existence d'un canal calcique appelé "Ca-induced Ca release channel" qui peut être ouvert soit par Sr, soit par Ca, de façon telle que la constante apparente de dissociation du site d'activation du canal est légèrement supérieure pour les ions Sr que pour les ions Ca. Par contre, la constante apparente de dissociation pour le site d'inhibition est identique pour les ions Sr et Ca.

III - EFFET SPECIFIQUE DE L'ADP SUR LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE

Deux interprétations de la création d'un largage calcique par l'Adénosine Di Phosphate peuvent être proposées. La première consiste à considérer que ce largage calcique est la conséquence de l'inversion de

de l'ATPase calcique avec synthèse concomittante d'ATP. Cette hypothèse a été présentée dans le chapitre "Historique". La deuxième consiste à envisager un rôle de modulation de l'amplitude du mécanisme de Ca-induced Ca release comme cela a été proposé par FABIATO et FABIATO (1975 a) sur les cellules cardiaques. De nombreux éléments expérimentaux semblent prouver que l'inversion de la pompe n'est pas un mécanisme physiologique.

Des expériences antérieures effectuées sur des cellules cardiaques pelées (FABIATO et FABIATO, 1978 a ; 1978 b) et sur des vésicules isolées du RS (KIRCHBERGER et WONG, 1978) ont conduit à envisager que le mécanisme de "Ca-induced Ca release" utilise une partie du mécanisme impliqué dans l'accumulation calcique. En effet, l'addition d'AMP cyclique (FABIATO et FABIATO, 1978 c) ou l'augmentation du pH (FABIATO et FABIATO, 1978 d) deux conditions augmentant l'accumulation calcique par le RS, diminue la concentration calcique seuil nécessaire au largage calcique. Cependant, une augmentation en magnésium libre qui augmente l'accumulation calcique, augmente la valeur seuil d'ions Ca nécessaires au largage calcique (FABIATO et FABIATO, 1975 b). Il semble donc que l'hypothèse d'une participation directe du mécanisme d'accumulation calcique doive être abandonné. De plus, des expériences effectuées sur des fibres pelées de muscle squelettique montrent que non seulement l'ATP mais aussi l'ADP et l'AMP stimulent le largage calcique à partir du RS, alors que seul l'ATP stimule la pompe calcique (ENDO, 1981). A l'inverse, les analogues de l'ATP qui stimulent la pompe calcique ne stimulent pas le largage calcique.

L'absence de similitude d'effets de ces divers constituants cellulaires sur la pompe calcique et le mécanisme de largage calcique nous oblige à dissocier ces deux mécanismes. Il n'est cependant pas impossible

que l'ATPase calcique soit une zone de passage des ions calciques largués (CHIESI et coll., 1981).

IV - LARGAGE DE CALCIUM EN PRESENCE DE TEA Cl.

Les résultats exposés précédemment montrent que le TEA Cl (50 mM) diminue le largage calcique à partir du RS. Nous avons tout le long de l'exposé signalé les points qui méritent discussion. Nous allons les aborder ici.

A - Incidence du TEA Cl sur l'absorption lumineuse du complexe Ca-Arsenazo

L'établissement des courbes d'étalonnage en arsenazo doit être impérativement fait dans les milieux dans lesquels seront baignées les fibres pendant la mesure optique. En effet, tout apport d'un composé dans la solution arsenazo est susceptible de modifier la conformation de la molécule d'arsenazo (libre ou complexée au calcium), et par conséquent son spectre d'absorption. Le phénomène a été récemment rapporté par BEST et ABRAMCHECK (1985). Ces auteurs ont mis en évidence que la caféine forme un complexe de stoechiométrie 1 : 1 avec l'arsenazo. La création de ce complexe induit une diminution de l'amplitude de l'absorption lumineuse.

De façon comparable, nous pourrions expliquer la différence d'amplitude entre l'absorption lumineuse différentielle du milieu caféinique et celle du milieu caféine + TEA Cl. On peut en effet envisager que le TEA Cl a un effet direct sur les propriétés optiques de l'arsenazo libre

et/ou du complexe Ca-arsenazo, ou qu'il modifie l'interaction entre la caféine et la molécule d'arsenazo.

B - Largage calcique par le RS

Après le commentaire de la figure 62 nous avons conclu qu'en présence de TEA Cl le largage est réduit, car la tension enregistrée est diminuée et le signal différentiel nul ou, plus précisément, inférieur à la sensibilité de nos appareils d'enregistrement. L'estimation de la concentration de calcium myoplasmique donnée par l'arsenazo est de $116 \mu\text{M}$, ce qui correspond à une pCa inférieure à 4.0. L'on sait que dans ces conditions la tension développée par la fibre est maximale et que le TEA Cl 50 mM n'induit alors aucune chute de la tension développée par les protéines contractiles (Fig. 60). Nous pouvons ainsi attribuer, sans erreur possible, la diminution de la tension à une diminution du largage.

L'absence de variation du signal différentiel, malgré l'existence manifeste d'un largage calcique (la tension), peut être expliquée par les valeurs différentes des constantes d'association apparentes des sites de la troponine et de l'arsenazo pour le calcium. SCARPA et coll. (1978) donnent pour l'arsenazo une valeur comprise entre $1.67 \cdot 10^4$ et $6.67 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, tandis que la constante d'association des deux sites de la troponine spécifiques au calcium, déterminée par POTTER et GERGELY (1975), est de $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Cela signifie que l'affinité de la molécule d'arsenazo pour le calcium est inférieure à celle de la troponine, et que la faible quantité de calcium larguée dans l'exemple cité (en présence de TEA Cl), va préférentiellement se fixer sur les sites à plus haute affinité c'est à dire à la

troponine : le signal de tension se trouve favorisé par rapport au signal d'absorption.

Le fait qu'une tension se développe alors que le signal d'absorption lumineuse reste inchangé prouve que le signal différentiel arsenazo que nous utilisons permet d'éviter la perturbation de la mesure par ce qu'on appelle un "artefact de mouvement". En effet, SCARPA et coll. (1978) rapportent que tout mouvement de la fibre est susceptible de créer une déflexion du signal arsenazo ne correspondant pas à une augmentation de la concentration calcique, mais à une modification de réfringence des myofilaments. Ces mêmes auteurs conseillent l'utilisation d'un signal différentiel pour contourner ce problème technique.

En conclusion, on peut émettre les hypothèses suivantes pour le mode d'action du TEA au niveau de la membrane du RS :

- soit le TEA altère directement la structure moléculaire de la membrane du RS d'une façon telle que la capacité de largage calcique est diminuée,

- soit le TEA diminue la sensibilité de la membrane à la caféine sans modifier sa capacité de largage.

ACTIVITE DE L'ATPASE CALCIQUE DU RS : INTENSITÉ DE LA CAPTURE DU CALCIUM.

I - ACTIVITE ATPasique DANS LES CONDITIONS NORMALES

D'après la figure 34 le temps nécessaire pour charger maximale-
ment le réticulum sarcoplasmique lorsqu'une solution de concentration pCa 6.6
est présente dans le milieu extraréticulaire, est voisin de 5 minutes.
Cette lenteur ne permet pas d'expliquer la relaxation rapide (de l'ordre
de 50 msec) observée sur des contractions induites par une dépolarisation
membranaire (voir Fig. 25). Une des explications serait que la concentra-
tion calcique intracellulaire au pic de la secousse musculaire est très
certainement plus élevée que la concentration calcique correspondant à
 pCa 6.6. Or, nous avons vu dans le chapitre "Historique" que l'activité
de l'ATPase calcique est fonction de la concentration calcique extraréti-
culaire. On peut donc envisager qu'au pic ou même avant le pic de la
contraction, la concentration calcique soit plus favorable à l'activité
de l'ATPase calcique que la solution de concentration pCa 6.6. Ceci semble
d'autant plus exact que WOOD (1978) a montré sur les fibres musculaires
humaines par une méthode identique à la nôtre que le temps nécessaire
pour que le RS soit chargé maximale-ment est d'autant plus court que la
 pCa est faible (comparaison entre pCa 7.0 et 6.4). Une autre explica-
tion serait que sur les fibres intactes, le réticulum sarcoplasmique est
moins chargé en calcium qu'il ne l'est lors de la charge calcique maximale
que nous effectuons sur les fibres pelées (pCa 6.6, 5 min). Comme la

Auteurs	Préparation	Technique	Activité ATPasique		T°
			nmol Ca/mg/sec	<i>μmol Ca/l fibre/sec</i>	
HASSELBACH (1964)				50 à 500	
INESI et SCARPA (1972)	Vésicules isolées de Lapin	"Stop flow apparatus"	70	<i>350</i>	25°C
MADEIRA (1975)	Vésicules isolées	Electrode sensible	11	<i>55</i>	18°C
BRIGGS et coll. (1977)	Vésicules isolées	Millipore filtration	166	<i>830</i>	25°C
KOMETANI et KASAI (1978)	Vésicules isolées	Dispersion lumineuse	20	<i>100</i>	
VERJOVSKI-ALMEIDA et INESI (1979)	Vésicules isolées de Poulet		6.5 - 7.5	32.5 - 37.5	
FORD et PODOLSKY (1972)	Fibre pelée	Mesure de la contraction		270	21°C
ENDO (1977)	Fibre pelée de Grenouille	Mesure de la contraction		70	0°C
SALVIATI et coll. (1982)	Fibre pelée rapide humaine	dispersion lumineuse		90	20°C
	fibre pelée de psoas de Lapin	dispersion lumineuse		20 - 30	25°-29°C

Les nombres inscrits en italiques ont été calculés en admettant l'existence de 5 g de protéine de la membrane du RS par litre de fibre (LUFF et ATWOOD, 1971).



vitesse du transport est d'autant plus élevée que la concentration calcique intraréticulaire est faible (voir "Historique"), il est compréhensible que la vitesse de relaxation soit plus rapide que la vitesse de charge maximale du RS. Cependant, ces deux explications ne semblent pas suffisantes pour expliquer la très grande différence de rapidité de ces deux phénomènes. En effet, récemment GILLIS (1985) dans une revue de questions fait état des vitesses maximales du transport calcique via la Ca-ATPase, obtenues par divers auteurs, sur divers muscles à l'aide de techniques variées soit sur des vésicules isolées du RS soit sur des fibres pelées. Ces valeurs reportées dans le tableau ci-après montrent la grande variabilité des résultats obtenus. Dans nos conditions expérimentales et sur la fibre de Crabe, en admettant que la charge calcique maximale est égale à 20 mM (HASSELBACH et OETLIKER, 1983), nous obtenons une vitesse du transport calcique égale à 67 $\mu\text{mol/l fibre/sec}$. Certes, si nous nous situons dans la large gamme de valeurs rapportées, on ne peut s'attendre, dans l'état actuel des techniques, qu'à obtenir des valeurs de la vitesse maximale de l'activité ATPasique ne permettant pas d'expliquer la rapidité avec laquelle une fibre musculaire intacte se relâche lors du développement d'une contraction induite par une dépolarisation membranaire. Donc ni les vésicules isolées du RS ni les fibres musculaires pelées ne sont un bon matériel pour déterminer l'activité ATPasique in vivo de l'ATPasique calcique. De plus, bien qu'un article récent de LUDI et HASSELBACH (1985) démontre la possibilité d'isoler cette ATPase, ils obtiennent par addition de myristoylglycérophosphocholine une activité ATPasique comparable à celle obtenue sur les vésicules isolées du RS. La nécessité d'apport de phospholipides est compréhensible puisque nous avons vu dans le chapitre "Historique" que l'environnement phospholipidique

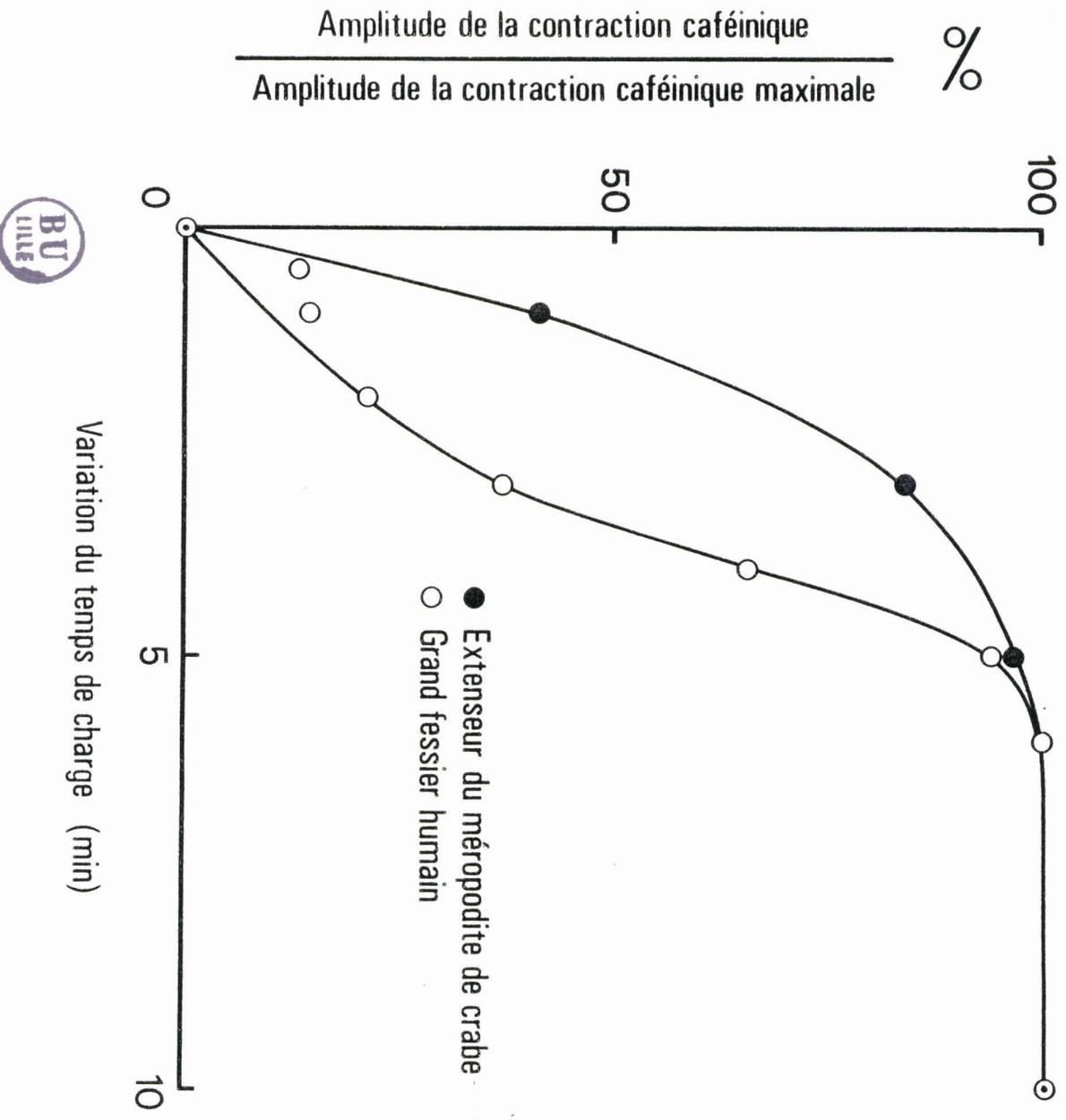


Figure 73 : Evolution de l'amplitude de la contraction caféinique exprimée en % de la contraction caféinique maximale (ordonnée) en fonction du temps de charge du RS par une solution pCa 6.6 (abscisse) :

(●) sur le muscle extenseur du méropodite de Crabe.

(○) après la courbe illustrée à la figure 34 de cet ouvrage.

(○) sur le muscle grand fessier humain.

D'après MOUNIER et GOBIET (1983).

est une condition nécessaire à l'expression de l'activité ATPasique de la Ca-ATPase.

Cependant si la technique permettant une détermination de l'activité ATPasique de l'ATPase calcique conciliable avec la vitesse de relâchement de la contraction n'existe pas encore, il n'en demeure pas moins que soit la technique utilisant les vésicules isolées du RS, soit celle utilisant les fibres pelées permettent d'effectuer des comparaisons de muscle à muscle ou encore des comparaisons sur un même muscle dans des conditions physiologiques variées. C'est ce que nous avons effectué pour les fibres musculaires de Crabe et les fibres musculaires du muscle grand fessier humain. Les courbes traduisant l'évolution sur ces deux muscles de l'amplitude de la contraction caféinique (Caf 20 mM) exprimée en % de l'amplitude de la contraction caféinique maximale en fonction du temps de charge calcique par la solution pCa 6.6 sont illustrées à la figure 73. On observe une allure de courbe différente. En effet, sur le muscle de grand fessier humain, la vitesse d'abord lente semble s'accélérer au-delà de 3 minutes pour à nouveau se ralentir après 5 minutes. Le maximum est atteint vers 6 minutes. Sur le muscle de Crabe, la vitesse du transport calcique est tout d'abord très rapide puis elle tend à se ralentir de façon constante jusqu'à l'atteinte de la charge calcique maximale vers 6 minutes de charge. Cette courbe obtenue sur la fibre de Crabe est facilement explicable par le fait établi et rapporté dans le chapitre "Historique" que la vitesse du transport calcique est d'autant plus ralenti que la concentration calcique intraréticulaire est élevée. Plus le temps de charge est long, plus la concentration calcique intraréticulaire est élevée et donc plus la pente de la courbe variation

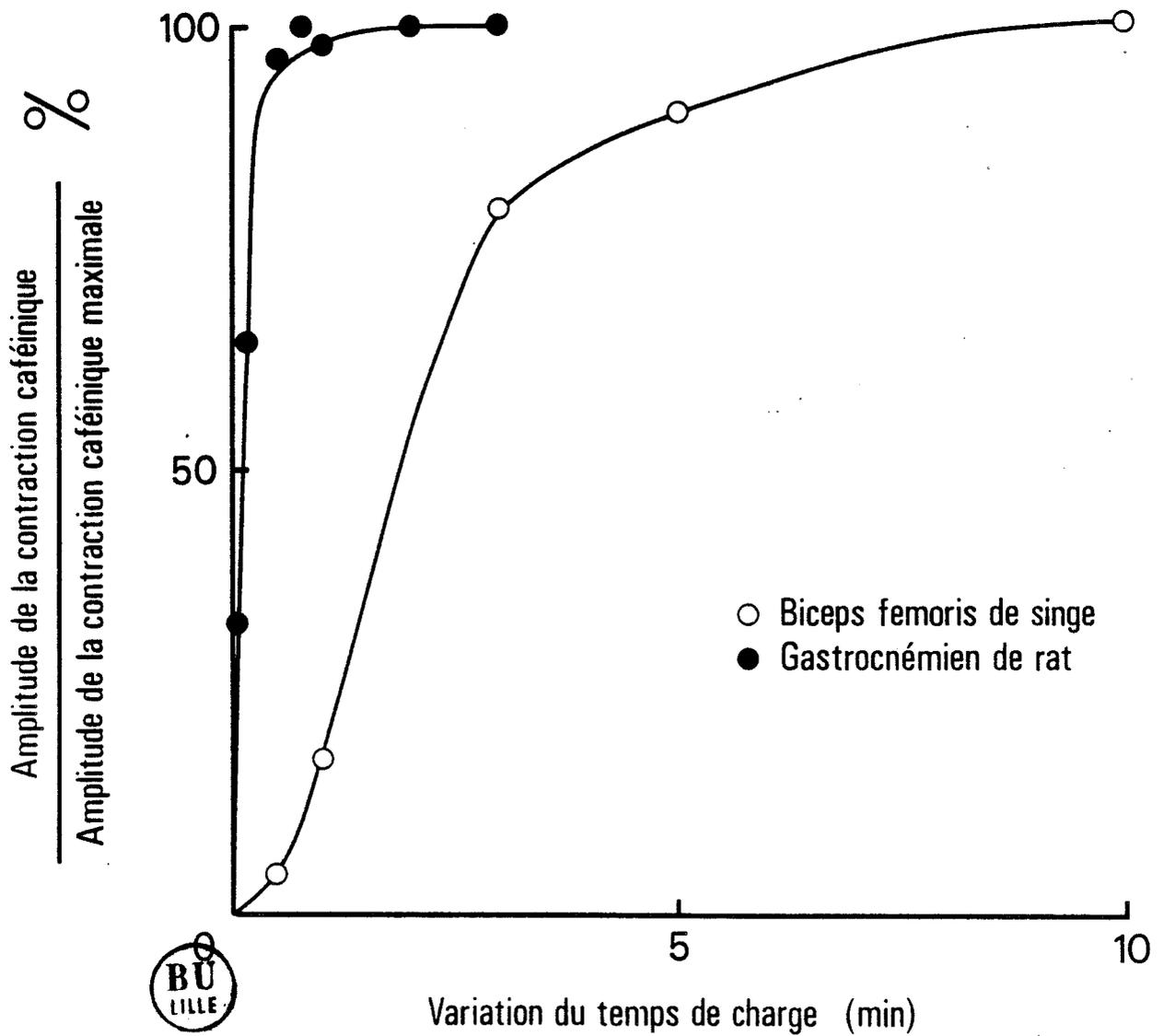


Figure 74 : Evolution de l'amplitude de la contraction caféinique exprimée en % de la contraction caféinique maximale (ordonnée) en fonction du temps de charge du RS par une solution pCa 6.8 (abscisse) :

(●) sur le muscle gastrocnémien de Rat.

D'après GOBLET et coll. (1984).

(○) sur le muscle biceps femoris de Singe.

Résultats non publiés.

du temps de charge, traduisant la vitesse du transport calcique, est affaiblie. Pour la fibre musculaire du muscle grand fessier humain, l'interprétation est plus complexe. Comment expliquer la vitesse lente puis rapide entre 3 et 5 minutes de charge? Pour l'instant aucun élément bibliographique n'existe.

Un même type d'expérience a été effectué sur deux autres muscles : le muscle biceps femoris de Singe et le muscle gastrocnémien de Rat. Cependant, les résultats ne peuvent être comparés à ceux antérieurement décrits dans la mesure où pour ces deux muscles la solution de charge choisie a été pCa 6.8. En effet, sur ces deux muscles le seuil d'activation directe des protéines contractiles est abaissé et lors d'une charge calcique à pCa 6.6, le muscle développe une contraction. Même si le développement de cette contraction n'est pas susceptible de modifier la vitesse et l'amplitude du transport calcique par le RS, la mise sous tension pendant plusieurs minutes fragilise les fibres interrogées. Cette différence de solution calcique de charge rend impossible la comparaison avec les deux muscles présentés ci-dessus puisque nous avons vu dans le chapitre "Historique" que la vitesse du transport calcique est fonction de la concentration calcique extraréticulaire.

La comparaison des courbes exprimant l'évolution de l'amplitude de la contraction caféinique (exprimée en % de la contraction caféinique maximale pour chaque muscle) en fonction du temps de charge est illustrée à la figure 74. Cette figure montre clairement une vitesse du transport calcique beaucoup plus rapide sur le muscle gastrocnémien de Rat que sur le muscle biceps femoris de Singe. Enfin les maxima sont atteints pour 2 minutes et 10 minutes de charge respectivement.

En conclusion, une comparaison entre muscles dans des conditions expérimentales identiques permet de comparer la vitesse de fonctionnement de la Ca-ATPase.

Les enregistrements illustrés à la figure 31 montrent que quelle que soit la concentration caféinique utilisée les contractions sont maintenues. Ce résultat diffère de ceux que nous avons obtenus sur les fibres humaines chimiquement pelées (MOUNIER et GOBLET, 1983). En effet, sur ces dernières, on observe qu'une contraction induite par 2.5 mM caféine après une charge calcique maximale (pCa 6.6, 5 minutes) tend à se relâcher. Cette différence pourrait être due à une sensibilité plus forte de la Ca-ATPase à la caféine. Le pompage serait donc plus fortement inhibé que sur les fibres musculaires humaines et la contraction maintenue. Il pourrait être également dû indépendamment de l'action de la caféine à une vitesse de capture calcique plus élevée sur le muscle grand fessier humain que sur le muscle de Crabe comme cela est illustré à la figure 73.

II - ACTIVITE ATPasique EN PRESENCE DE TEA Cl

Notre étude du pompage montre une diminution du fonctionnement de l'ATPase calcique en présence de TEA Cl 50 mM. Avant d'exposer les hypothèses d'action du TEA Cl sur l'activité ATPasique du RS, nous voudrions commenter l'aspect particulier des tensions présentées à la figure 65. Cela nous amène à aborder à nouveau les phénomènes de la contraction musculaire au niveau des protéines contractiles. Ces tensions dites biphasiques présentent un pic initial de forte amplitude qui ne correspond pas à un accroissement parallèle de la concentration calcique. JULIAN et coll. (1978) proposent une interprétation de la tension biphasique selon laquelle le raccourcissement des différents sarcomères d'une fibre pelée et fixée aux deux extrémités ne serait pas homogène. Il y aurait, dans un premier temps, raccourcissement des sarcomères localisés près des points de fixation et élongation des sarcomères situés au centre de la fibre. Dans un second

temps, il s'effectuerait une redistribution des forces aboutissant à des longueurs homogènes de sarcomères tout le long de la fibre. C'est pourquoi on obtiendrait le décours de contraction consistant en une augmentation rapide de la tension suivie d'une diminution jusqu'au niveau stable (Fig. 65).

Voyons à présent quelles composantes du mécanisme du pompage de calcium sont susceptibles d'être affectées par le TEA Cl, par un rappel des caractéristiques connues de l'ATPase calcique du RS.

Nous avons vu dans le chapitre "Historique" que l'ATPase calcique du RS est une protéine présentant 4 classes de sites de fixation pour les ions divalents. Deux sites ont une grande affinité pour le calcium et sont situés à l'extérieur de la membrane. Ils sont responsables de la fixation calcique initiale avant le transport proprement dit vers la lumière du RS. Un autre site est un site de fixation pour le magnésium. Ce site permet au magnésium de jouer son rôle de catalyseur de la réaction enzymatique. Enfin, il existe un site calcique situé à l'intérieur de la membrane. On peut envisager que le TEA, ion positif, inhibe de façon compétitive la fixation soit des ions Ca soit des ions Mg sur leurs sites respectifs, ou encore qu'il gêne par empêchement stérique la fixation de ces deux cations, diminuant de ce fait la vitesse de capture du calcium par le RS.

PROPRIETES DES PROTEINES CONTRACTILES

Avant d'aborder les différents points de discussion il faut rappeler que le Mg ATP est le substrat de la réaction ATPasique se situant au niveau de la partie S_1 de la myosine et conduisant au développement de la contraction. Il est donc impératif que la concentration en MgATP dans nos solutions activatrices soit une concentration optimale pour le développement de la contraction. Ceci est le cas car nos solutions activatrices contiennent 2.0×10^{-3} M de Mg ATP. Or, CHAEN et SUGI (1982) ont rapporté sur les fibres musculaires de Crabe des valeurs en Mg ATP pour le développement optimal de la force et de l'activité ATPasique respectivement égales à 10^{-5} M et 10^{-4} M. Ces optima se maintiennent pour des concentrations supérieures à 10^{-3} M.

I - PROPRIETES DES PROTEINES CONTRACTILES DANS LES CONDITIONS NORMALES

A. Stabilité des contractions calciques

La figure 37 nous a révélé qu'amplitude et cinétique globale (latence + temps de mise sous tension maximale) de deux contractions successives induites par une même solution pCa sont inchangées. Le choix d'une solution pCa 5.8 induisant une contraction maximale pourrait être critiqué, dans la mesure où une éventuelle augmentation de la seconde tension ne peut être repérée. Cependant, le choix de cette pCa se justifie dans la mesure où il nous permet de nous mettre dans des conditions favorables à une dimi-

nution éventuelle des réponses de la fibre musculaire due à la fatigue (amplitude élevée de la contraction), tout en nous laissant la possibilité de déceler une éventuelle facilitation de la seconde contraction par l'observation de la cinétique. En effet, si l'amplitude de la contraction induite par une solution pCa 5.8 est maximale, son temps de mise sous tension est plus lent que celui de la contraction induite par une solution pCa 4.8 (voir Fig. 39). On observe que l'amplitude de la seconde contraction est inchangée et que son temps de mise sous tension maximale est légèrement augmenté. Il n'y a donc ni facilitation ni diminution notable de la seconde contraction. Paradoxalement, la latence est diminuée de 15 %. Cette diminution du temps de latence pourrait être due à la persistance de ponts à longue durée de vie, créés entre actine et myosine lors de la première contraction et maintenus dans l'état attaché malgré l'application d'une solution relaxante. Un tel état des ponts a été appelé "long-life state of attachment of cross-bridges" (CECCHI et coll., 1982). Puisque l'augmentation de la force est proportionnelle au nombre de ponts formés, l'existence de ponts de longue vie permettrait d'expliquer que pour une concentration calcique donnée, la seconde contraction devient décelable en un temps plus court.

B. Interprétation de la courbe tension-pCa

Il est classiquement établi que les valeurs de pCa_{50} et du coefficient de Hill (n) déterminées à partir de la relation tension relative-pCa sont respectivement le reflet de l'affinité des sites calciques de la troponine et du nombre de sites calciques impliqués dans la contraction. Cependant, des rapports récents viennent modifier cette conception (BRANDT et coll., 1980 ; 1982).

1. Détermination du coefficient de Hill

Le coefficient de Hill est déterminé en ajustant les points expérimentaux à l'équation suivante :

$$P/P_0 = (C.K)^n / 1 + (C.K)^n$$

où C est la concentration calcique et P/P_0 la tension normalisée.

K est la constante d'association du calcium pour la troponine.

Si le coefficient reflète effectivement le nombre de sites calciques de la troponine impliqués dans la contraction, en admettant une coopérativité maximale entre tous les sites, n ne peut être supérieur à 4. Or, nous obtenons sur la fibre musculaire de Crabe une valeur de n comprise entre 4.50 et 5.75. Si de nombreux auteurs rapportent une valeur de n égale à 3 (BRANDT et coll., 1972 ; JULIAN, 1972 ; ORENTLICHER et coll., 1977 ; FABIATO et FABIATO, 1978 e ; MOISESCU et THIELECZEK, 1979) et même inférieure (HELLAM et PODOLSKY, 1969 ; DONALDSON et HERRICK, 1975) des rapports plus récents font état de valeurs supérieures à 4 (BRANDT et coll., 1980 ; 1982 ; GODT et LINDLEY, 1982 ; SHINER et SOLARO, 1984). BRANDT et coll. (1980) proposent l'interprétation suivante. Parmi les mécanismes qui pourraient modifier la pente de la courbe tension-pCa par rapport à celle de la courbe traduisant la fixation des ions Ca en fonction de la pCa, l'un deux est la relation existant entre le temps mis par un pont (unité S_1 de la myosine) pour effectuer son cycle d'attachement - détachement avec l'actine et la durée de vie du complexe Troponine- Ca^{++} . La 1/2 vie du complexe troponine- Ca^{++} a récemment été estimée à 2-3 msec (JOHNSON et coll., 1979) et on peut

estimer que la durée du cycle attachement-détachement est plus longue que le temps de fixation du calcium sur le troponine. Dans ces conditions, la concentration nécessaire en calcium pour atteindre 50 % de la force maximale sera moins importante que celle nécessaire à la demi-saturation des sites régulateurs de la troponine. Dans ces conditions, si le temps d'attachement - détachement des ponts ne varie pas lorsque la tension augmente, la relation tension-pCa sera parallèle à la courbe reliant la quantité de Ca fixé sur la troponine à la pCa. Cependant, sur les fibres intactes il est établi que la force interne diminue la vitesse du cycle des ponts. S'il en est de même sur les fibres pelées, la relation tension-pCa ne sera pas parallèle à la courbe reliant la quantité de calcium fixé à la pCa. De plus, si le temps mis par un pont pour effectuer son cycle d'attachement - détachement augmente quand la tension augmente, la courbe tension pCa obtenue expérimentalement sera une courbe composite produite par un déplacement le long d'une famille de courbe (Fig. 75). Cette famille consiste en des courbes toutes parallèles à la courbe quantité de Ca fixé-pCa avec le point milieu déplacé vers la gauche en fonction de la durée du cycle des ponts. Ce déplacement progressif aboutit à une relation tension-pCa qui est plus raide que la courbe quantité de Ca fixé-pCa.

Si cette théorie est correcte on doit admettre que des conditions expérimentales permettant d'éliminer la force développée par la fibre musculaire doivent donner des résultats tels que la courbe traduisant la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase de la myosine en fonction de la pCa doit avoir une pente proche de la courbe reliant la quantité de Ca fixée sur la

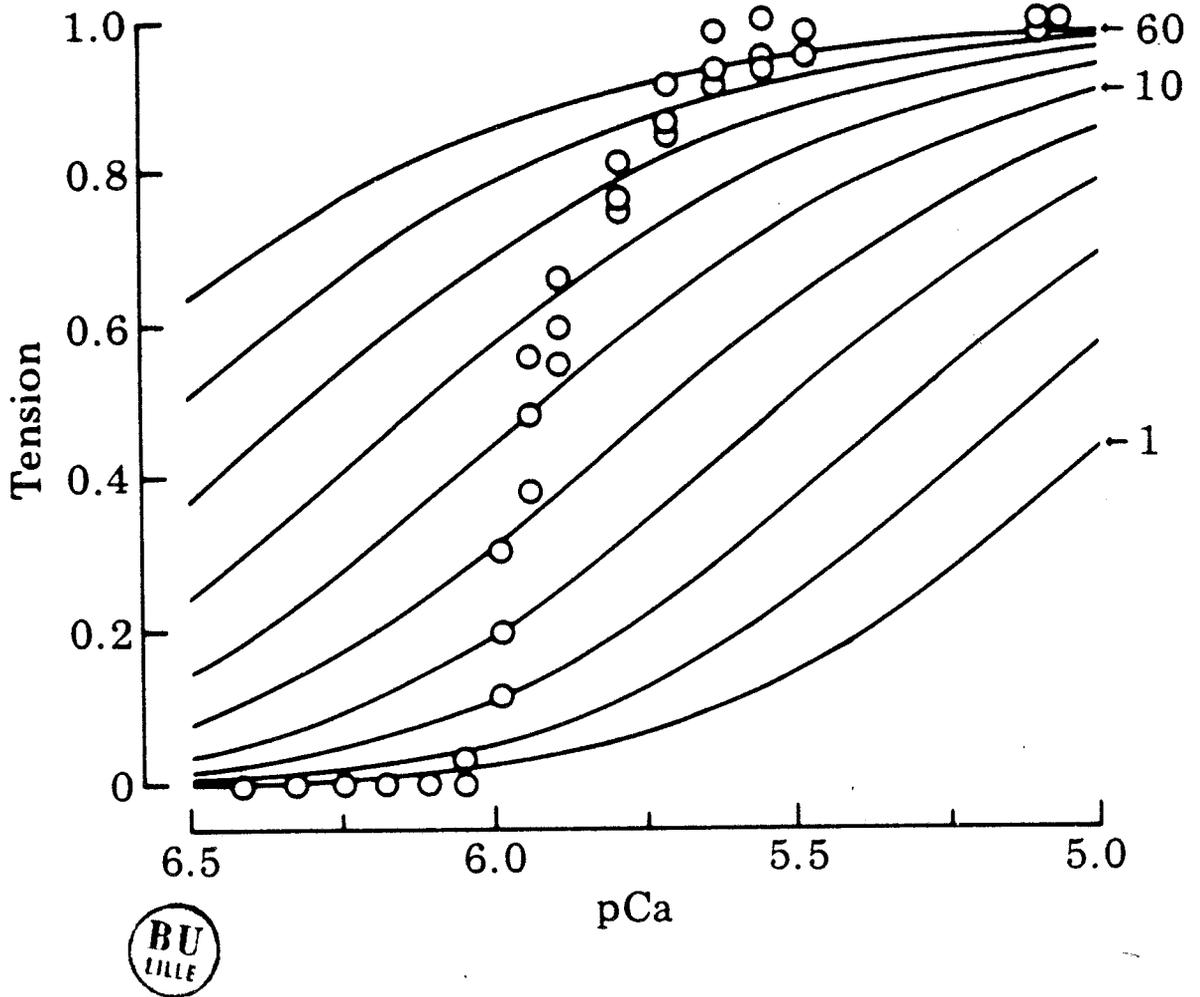


Figure 75 : Relation tension-pCa sur la fibre du muscle psoas de Lapin (O) et famille de courbes tension-pCa hypothétiques calculées en admettant que les ions Ca^{++} se fixent indépendamment sur deux sites de la TnC et qu'ils doivent être tous les deux occupés pour permettre le développement de la tension. La courbe numérotée 1 est construite en admettant un $\text{pK}_d = 5.3$; les autres courbes sont construites en admettant une augmentation de pK_d de 0.2 unités.

D'après BRANDT et coll. (1980).

troponine à la pCa c'est-à-dire une pente moins raide que la relation tension-pCa. Effectivement, chaque fois que la vitesse d'hydrolyse de l'ATP a été mesurée sur des protéines isolées ou des préparations myofibrillaires ne pouvant développer de contraction, on observe un parallélisme entre les courbes vitesse de l'hydrolyse de l'ATP-pCa et quantité de calcium fixé - pCa (POTTER et GERGELY, 1975). Par contre, l'établissement de la courbe vitesse de l'hydrolyse de l'ATP-pCa sur des fibres pelées conduit à l'obtention de courbes présentant une pente plus raide (LEVY et coll., 1976).

En conclusion, assimiler la relation tension-pCa à la courbe reliant la quantité de calcium fixé sur la troponine à la pCa, c'est ne pas tenir compte du fait que le développement de la tension est une résultante de trois étapes importantes

- la fixation du calcium sur la troponine C
- l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase de la myosine
- le développement de la force.

Il s'en suit donc que le coefficient de Hill ne traduit pas fidèlement le nombre de sites calciques impliqués dans la contraction.

2. Détermination de l'affinité des sites calciques de la troponine

La valeur de pCa pour laquelle la contraction est égale à 50 % de la tension maximale est supposée donner une image de l'affinité des sites calciques de la troponine : plus la pCa est faible plus l'affinité

est faible (FUCHS, 1977). Cependant cette équation suppose une identité entre la courbe tension-pCa et la courbe quantité de calcium fixée sur la troponine-pCa. Or, pour les raisons exposées dans le paragraphe précédent, nous savons qu'il n'en est rien. C'est pourquoi BRANDT et coll. (1982) proposent une autre interprétation. Comme nous l'avons vu précédemment une non égalité entre le temps mis pour un pont à effectuer le cycle d'attachement - détachement et la durée de fixation des ions Ca sur la troponine conduit à un déplacement parallèle de la relation tension-pCa par rapport à la relation quantité de Ca fixée - pCa, le long de l'axe des pCa. C'est pourquoi, d'après ces auteurs tout déplacement parallèle d'une courbe tension-pCa par rapport à une autre traduira une modification de la relation existant entre la vitesse de mouvement des ponts et le temps de fixation du calcium : un déplacement de la relation tension-pCa vers la gauche dans des conditions expérimentales particulières pourra être le résultat de la diminution de la vitesse de mouvements des ponts s'il est admis que la durée de fixation calcique est inchangée par ces nouvelles conditions physiologiques.

Notons cependant qu'il existe des conditions pour lesquelles un déplacement de la relation tension-pCa le long de l'axe des pCa peut être le résultat d'une modification de l'affinité calcique de la troponine. C'est le cas par exemple d'une augmentation en Mg^{++} créant un déplacement vers les pCa plus faibles (DONALDSON et KERRICK, 1975).

L'interprétation exposée ci-dessus est encore à l'état d'hypothèse. C'est pourquoi tout le long de l'exposé des résultats nous avons rapporté les valeurs de pCa_{50} ainsi que de n_H lorsqu'elles ont été modifiées par des

milieux physiologiques anormaux. Nous discuterons dans la suite de ce chapitre de la signification physiologique de ces modifications d'une part dans le cadre des théories classiquement admises et d'autre part dans le cadre de la théorie de BRANDT et coll. (1980, 1982).

II - PROPRIETES DES PROTEINES CONTRACTILES EN PRESENCE DES IONS STRONTIUM

Les résultats rapportés à la figure 49 indiquent que les ions strontium peuvent activer directement les protéines contractiles. Cependant, la comparaison de la tension induite par 0.3 mM Sr et 0.3 mM Ca montre que les ions Sr sont beaucoup moins efficaces dans l'activation de ces protéines.

A partir des relations tension-pCa et tension-pSr, trois points peuvent être soulignés : i) la quantité maximale d'ions Sr fixés est identique à la quantité maximale d'ions Ca fixés puisque P_0^{Ca} et P_0^{Sr} ont des amplitudes identiques, ii) pCa_{50} et pSr_{50} sont respectivement égaux à 6.46 et 4.14, iii) la pente de la relation tension-pSr est plus faible que la pente de la relation tension pCa puisque les n_H sont respectivement égaux à 1.59 et 4.50.

L'existence d'une amplitude identique pour P_0^{Ca} et P_0^{Sr} semble être en contradiction avec les résultats de STEPHENSON et WILLIAMS (1980) selon lesquels P_0^{Sr} est égal à 10% de P_0^{Ca} sur la fibre musculaire de Crabe. Cependant, ils font remarquer que P_0^{Sr} peut être égal à 90 % de P_0^{Ca} si la fibre musculaire interrogée a été disséquée peu de temps avant l'expé-

rimentation. Cette modification des résultats en fonction de la fraîcheur de la préparation m'incite à faire état d'un résultat préliminaire concernant le dosage d'arginine kinase tel que nous l'avons décrit dans le chapitre "Résultats". En effet, nous avons rapporté une activité arginine kinase égale à 320.06 ± 34.10 nmoles/min/mg à 17°C . Cependant, lors de l'expérimentation nous avons remarqué un autre lot de fibres donnant une valeur de l'activité arginine kinase égale à 44.73 ± 4.20 nmoles/min/mg à 17°C . Parmi plusieurs possibilités permettant d'expliquer cette différence importante, l'une d'entre elles est la suivante : le premier lot de fibres a été expérimenté juste après la dissection et le pelage. Le second lot a été maintenu approximativement 1 heure dans la solution relaxante contenant de l'ATP, après dissection et pelage. Bien que pour confirmer cette hypothèse il faille faire un nombre d'expériences plus important, il semblerait en effet que la fraîcheur de la préparation disséquée soit un élément à prendre en considération dans les résultats obtenus. Signalons ici que pour toutes les autres expériences, la dissection et le pelage ont eu lieu juste avant l'expérimentation. De plus la fragilité de notre préparation ne nous a jamais permis d'effectuer des expériences de longue durée.

Les valeurs différentes de $p\text{Ca}_{50}$ et $p\text{Sr}_{50}$ sont en accord avec les résultats de STEPHENSON et WILLIAMS (1980) puisque dans leurs conditions expérimentales, $p\text{Ca}_{50}$ est égal à 5.45 et $p\text{Sr}_{50}$ varie entre 4.10 et 4.35. En accord avec FUCHS (1977) cela signifierait que l'affinité de la troponine pour les ions Sr est moindre que pour les ions Ca. Ceci est en accord avec le résultat de EBASHI et coll. (1968) selon lesquels la constante d'affinité des ions Sr est égale à $1/27$ de la constante d'affinité des ions Ca pour la troponine. Si l'on tient compte de la théorie de BRANDT

et coll. (1982), le déplacement de la valeur de pSr_{50} vers la droite (pSr plus faibles) par rapport à la valeur de pCa_{50} peut signifier une augmentation de la vitesse du cycle attachement - détachement des ponts de la myosine. Cependant, ceci ne semble pas être le cas dans les conditions expérimentales présentes puisque le temps de mise sous tension maximale de l'activité mécanique est beaucoup plus important en présence d'ions Sr qu'en présence d'ions Ca, ou encore le rapport $\frac{dT}{dt}$ est plus faible. Dans la mesure où $\frac{dT}{dt}$ est le reflet de la vitesse avec laquelle les ponts entre l'actine et la myosine se forment, en présence d'ions Sr cette vitesse est beaucoup plus lente. Il s'en suit, que dans ces conditions expérimentales, le déplacement de la courbe vers la droite n'est pas le reflet d'une modification de comportement des ponts mais plus le reflet de l'existence d'une affinité moindre des ions Sr pour la troponine. Ce résultat n'est d'ailleurs pas fondamentalement en désaccord avec BRANDT et coll. (1982) puisque ces auteurs rapportent que dans certaines conditions le déplacement de la relation tension- pCa vers les pCa plus faibles (vers la droite) peut être une conséquence d'un amoindrissement de l'affinité de la troponine pour le calcium.

La diminution de la pente peut être due, dans le cadre de l'interprétation classique, à l'existence d'une relation quantité d'ions Sr fixés- pSr moins pentue que la relation quantité d'ions Ca fixés - pCa . Dans ce cas, en admettant qu'il n'y ait pas de modification de la coopérativité des sites, cela signifie qu'il y a moins de sites de la troponine impliqués dans l'activation des protéines contractiles par les ions Sr que par les ions Ca. Dans le cadre de la théorie de BRANDT et coll. (1980) on peut admettre qu'il n'y ait pas de modification de la pente de la courbe quantité

de Sr fixée - pSr comparativement à la courbe quantité de Ca fixée - pCa mais que l'augmentation de la contrainte interne de la fibre est moindre

lorsque l'on sollicite l'augmentation de l'activité mécanique de la fibre en faisant varier la valeur de pSr de 4.8 à 2.0 que lorsque l'on sollicite cette augmentation d'activité mécanique dans la gamme de pCa allant de 7.0 à 4.8 (voir Fig. 76). Dans ce cas, le passage d'une courbe à l'autre dans le faisceau de courbes parallèles illustré à la figure 76 s'effectuerait un nombre de fois moins important en présence d'ions Sr qu'en présence d'ions Ca.

III - PROPRIETES DES PROTEINES CONTRACTILES EN PRESENCE DE TEA Cl

1. Etude cinétique

En ce qui concerne l'effet du TEA Cl sur la cinétique de tension, nous pouvons à ce stade formuler plusieurs hypothèses :

D'après la théorie de HUXLEY (1957) l'amplitude de la tension (P) est liée à la vitesse de formation (f) et à la vitesse de détachement (g) des ponts entre l'actine et la sous-unité S₁ de la myosine par la relation :

$$P = \frac{f}{f+g} ,$$

c'est-à-dire qu'il existerait une relation inverse entre l'amplitude de la contraction et le temps de mise sous tension (à savoir que plus l'amplitude de la contraction est grande, plus le temps nécessaire pour l'atteindre est court).

On pourrait donc attribuer le ralentissement des contractions en milieu TEA C1 à l'affaiblissement de la contraction. Cependant, le tableau ci-dessous dressé à partir de nos résultats utilisant le protocole décrit pour l'étude des protéines contractiles montre qu'il n'en est rien.

	Sans TEA (n = 6)	avec TEA C1 50 mM (n = 13)
T (mg)	284 ± 26	288 ± 60
$\frac{dT}{dt}$ (mg/s)	5.6 ± 0.7	1.05 ± 0.07

Les résultats sont présentés sous la forme $\bar{x} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ (erreur standard par rapport à la moyenne).

T exprime l'amplitude de la contraction en mg.

$\frac{dT}{dt}$ exprime en mg/s, la vitesse théorique du développement de la tension.

Remarquons qu'il est fait abstraction des valeurs des solutions pCa utilisées afin de permettre la comparaison d'échantillons de tension dont la moyenne est similaire. La comparaison des valeurs de $\frac{dT}{dt}$ obtenues sans et avec TEA C1 montre clairement que la cinétique est affectée indépendamment de la tension puisqu'en présence de TEA C1 la vitesse moyenne de mise sous tension est divisée par 5,3. Cette remarque est confirmée par la figure 76, où nous avons superposé les contractions induites par une solution pCa 4.8 en absence et en présence de TEA C1, déjà présentées à la



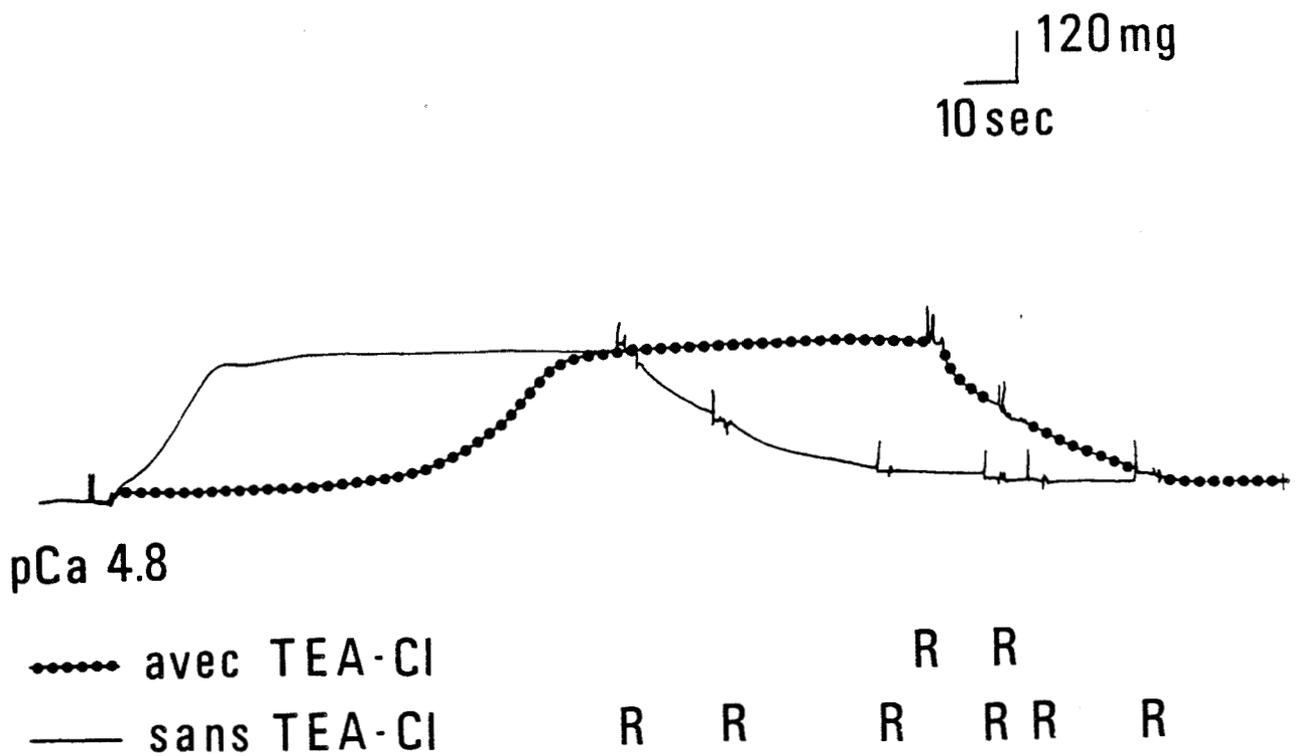


Figure 76 : Effet du TEA Cl sur la cinétique d'une contraction d'amplitude maximale.

Le TEA Cl diminue la vitesse de mise sous tension d'une fibre activée par une solution pCa 4.8, alors qu'il ne modifie pas l'amplitude finale de la contraction.

Fibre n° 151284.

figure 59. Ce montage nous rappelle que le TEA Cl n'a aucun effet sur l'amplitude de la tension maximale provoquée par une solution pCa 4.8, alors même qu'il ralentit très sensiblement la cinétique du phénomène. Dans ce cas, l'allongement du temps de mise sous tension ne peut être relié à une diminution de la force développée par la fibre, puisque l'amplitude finale est identique à 2 % près. Compte-tenu de l'équation précédemment citée, le TEA Cl - soit uniquement diminue la vitesse de formation des ponts, f , - soit diminue f et simultanément augmente la vitesse de détachement des ponts. Cet effet est un effet propre du tétraéthylammonium, puisque nous avons vu que les ions chlorure ne modifient pas le temps de mise sous tension maximale (voir Fig. 58).

2. Interprétation de la courbe tension-pCa

Le déplacement de la relation Tension-pCa vers les pCa plus faibles, associé à une contraction maximale inchangée en présence de TEA Cl (voir Fig. 60), laisse supposer l'existence d'une compétition entre le calcium et le TEACl pour la fixation sur les sites calciques de la troponine. La détermination de la faiblesse des effets des ions chlorure (voir Fig. 58) par rapport à ceux provoqués par le TEA Cl, nous permet de préciser que la diminution de tension doit être essentiellement attribuée à la molécule de TEA.

Notons ici que la diminution de l'amplitude de la contraction induite par les ions chlorure vient confirmer les résultats obtenus par ASHLEY et MOISESCU (1977) sur les fibres musculaires de Balane. Elle serait le résultat de l'inhibition de l'activité ATPasique de la myosine par les anions Cl^- .

APPORT DES CONTROLES EFFECTUES SUR LES FIBRES PELEES EN PRESENCE D'INHIBITEURS POTASSIQUES, SUR LA COMPREHENSION DU FONCTIONNEMENT DU CANAL CALCIQUE

Nous avons observé à la figure 56 qu'en présence de TEA (50 mM), le courant potassique transitoire I_{K1} est inhibé et le courant entrant I_i devient de grande amplitude. Simultanément, la contraction phasique dépendante du courant entrant calcique est très nettement augmentée. L'une de nos hypothèses pour expliquer ce résultat fut que l'augmentation importante de I_i en milieu TEA n'est pas uniquement due à un démasquage, par l'inhibition de I_{K1} , d'un I_{Ca} déjà existant dans les conditions normales, mais à une augmentation réelle du flux entrant calcique.

Nous avons cependant voulu auparavant tester les effets du TEA sur les composantes subcellulaires intervenant dans la contraction. Nos résultats ont montré que le TEA diminue les performances de tous ces éléments permettant le développement de la contraction. Il en résulte donc que l'augmentation de contraction observée ne peut être due qu'à l'augmentation réelle du courant entrant calcique. Cette conclusion est confortée par les résultats suivants: STINNAKRE et TAUC (1973) ont montré que la fluorescence obtenue par injection d'aequorine dans les neurones actifs d'Aplysie est augmentée de la même façon après injection de TEA et après application d'une solution normale enrichie en ions Ca^{++} . Ils en concluent que le TEA pourrait maintenir ouvert le canal calcique. De même, ATWATER et coll. (1974) ont montré sur la fibre musculaire de la balane Megabalanus posittacus

par mesure du flux du radioisotope ^{45}Ca , qu'en présence de TEA (60 mM) le flux calcique est augmenté (Fig.77): d'une valeur moyenne de 6.2 pmole/sec dans les conditions normales il atteint une valeur moyenne de 16.5 pmole/sec.

L'augmentation du courant calcique entrant pourrait être le résultat d'un effet pharmacologique propre du TEA sur le canal calcique. Une autre hypothèse est avancée: le courant sortant I_{K_1} et le courant entrant I_{Ca} passeraient par le même canal et le flux sortant d'ions K^+ générerait l'entrée des ions Ca^{++} . En présence de TEA, l'inhibition de I_{K_1} faciliterait donc l'entrée des ions Ca^{++} .

L'observation des effets de la 4 AP (1 mM) sur les courants ioniques membranaires (voir Fig. 69) et la contraction associée (voir Fig. 70) est d'interprétation plus délicate. L'augmentation transitoire de contraction alors que I_{K_1} est inhibé et I_i très nettement augmenté pourrait être due comme lors de la présence de TEA, à la facilitation de l'entrée des ions Ca quand I_{K_1} est inhibé. La diminution ultérieure de la contraction bien que le courant I_i reste de grande amplitude, semble être le résultat d'un effet direct de la 4 AP sur les protéines contractiles conduisant à une inhibition du développement de la force par les ponts entre l'actine et la myosine.

En conclusion, l'utilisation de ces deux inhibiteurs potassiques sur les fibres musculaires intactes, nous a permis, après un contrôle de leur action spécifique sur les acteurs subcellulaires de la contraction,

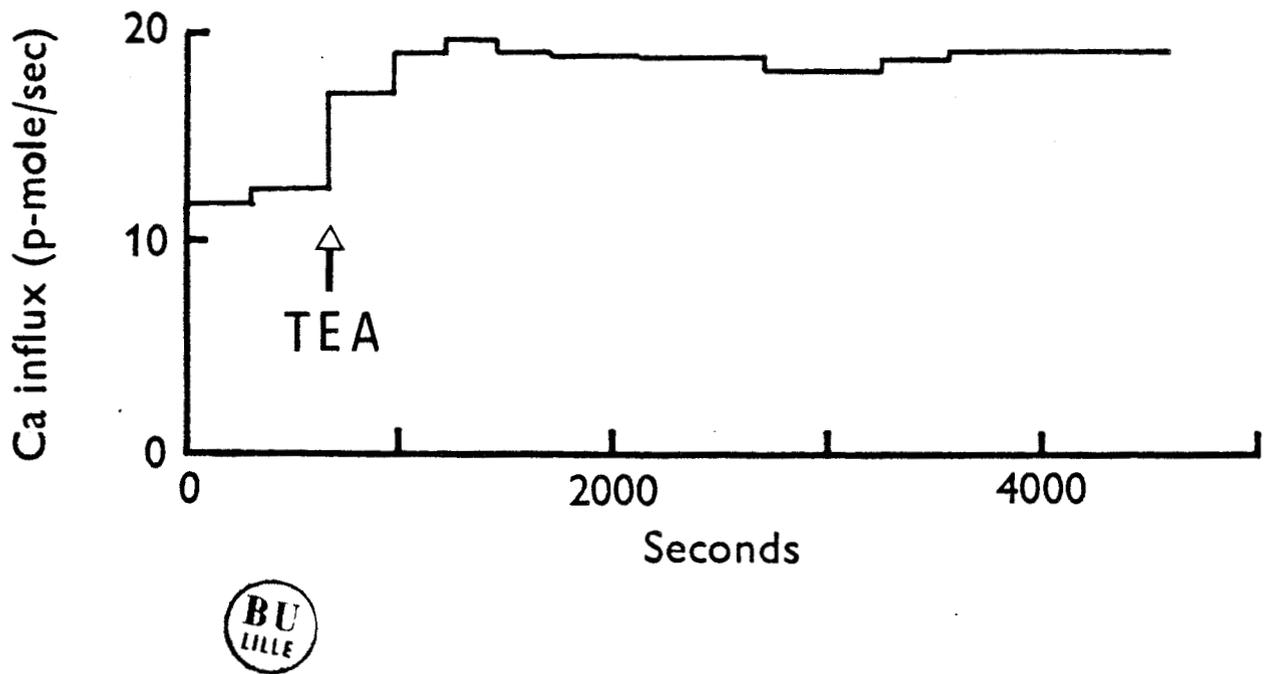


Figure 77 : Effet du TEA sur l'influx de ^{45}Ca sur les fibres musculaires de Balane.

(D'après ATWATER et coll., 1974)

de conclure à l'existence probable d'une gêne à l'entrée des ions Ca dans la cellule par l'efflux potassique. De plus, les effets de ces drogues au niveau subcellulaire mettent en évidence les précautions avec lesquelles les résultats obtenus sur des fibres intactes doivent être interprétés, lors de l'action de drogues diverses.

CONCLUSION

Le mécanisme permettant l'accroissement de la concentration calcique intracellulaire, condition nécessaire au développement de la contraction, a été étudié sur les fibres musculaires *intactes* et *pelées* du crabe *Carcinus maenas*. Les résultats ont montré que le mécanisme de libération calcique par le réticulum sarcoplasmique (RS) est de type "Ca-induced Ca release" gradué en fonction de la concentration calcique extraréticulaire. Cela signifie qu'une faible augmentation de la concentration calcique myoplasmique due aux flux entrants d'ions Ca (I_{Ca} ou l'échange Na-Ca), insuffisante pour activer les protéines contractiles, stimule le largage calcique par le RS et permet le développement de la contraction. L'amplitude de la libération des ions calcium est fonction de l'amplitude de la faible augmentation initiale de $[Ca]_i$. De plus, l'ATPase calcique située dans la membrane du RS semble intervenir par un mécanisme encore indéterminé qui pourrait être une modulation du mécanisme de "Ca-induced Ca release" par l'adénosine diphosphate. Enfin, un autre cation divalent, le strontium, stimule lui aussi le largage des ions calcium par le RS avec une moins grande efficacité.

Le type d'expériences effectué ainsi que le matériel biologique utilisé nous a permis d'obtenir, en outre, des informations concernant la capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique et la fixation des ions calcium sur les protéines régulatrices de la contraction. On observe également que outre le calcium, le strontium peut être activement transporté par l'ATPase calcique et peut se substituer au calcium sur les sites régulateurs de la troponine, avec cependant une efficacité moindre.

Enfin, l'intérêt des inhibiteurs des courants potassiques dans l'étude du couplage excitation-contraction, nous a conduit à tester les effets de deux d'entre eux, le tétraéthylammonium et la 4-aminopyridine, sur les acteurs subcellulaires de la contraction: le réticulum sarcoplasmique et les protéines contractiles. Les résultats montrent que le tétraéthylammonium diminue l'ensemble des performances de ces éléments subcellulaires tout en maintenant cependant la capacité qu'ont les protéines contractiles à développer une activité mécanique maximale. Quant à la 4-aminopyridine, elle a, sur les protéines contractiles, une action différenciée au cours du temps pour aboutir après 5 minutes d'action à une réduction très importante de l'activité mécanique.

BIBLIOGRAPHIE

A

ALLEN, D.G., BLINKS, J.R. & PRENDERGAST, F.G. (1977)

Aequorin luminescence : relation of light emission to calcium concentration - A calcium - independent component.

Science, 195, 996-998.

ALVAREZ-LEEFMANS, F.J., GAMIÑO, S.M., GIRALDEZ, F. & GONZALEZ-SERRATOS, H. (1985)

Intracellular free magnesium in frog skeletal muscle fibres measured with ion-selective microelectrodes.

Biophys. J., 47, 458 a.

ASHLEY, C.C. (1978)

Calcium ion regulation in barnacle muscle fibers and its relation to force development.

Ann. New York Acad Sci, 307, 308-329.

ASHLEY, C.C. & ELLORY, J.C. (1972)

The efflux of magnesium from single crustacean muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 226, 653-674.

ASHLEY, C.C. & MOISESCU, D.G. (1977)

Effect of changing the composition of the bathing solutions upon the isometric tension pCa relationship.

J. Physiol., Lond., 270, 627-652.

ASHLEY, C.C. et RIDGWAY, E.B. (1968)

Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibres.

Nature, 219, 1168-1169.

ASHLEY, C.C. & RIDGWAY, E.B. (1970)

On the relationship between membrane potential calcium transient and tension in single barnacle muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 209, 105-130.

ATWATER, I., ROJAS, E. & VERGARA, J. (1974)

Calcium influxes and tension development in perfused single barnacle muscle fibres under membrane potential control.

J. Physiol., Lond., 243, 523-551.

AXELSON, J. & THESLEFF, S. (1958)

Activation of the contractile mechanism in striated muscle.

Acta Physiol. Scand., 44, 55-60.

B

BARLOGIE, B., HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. (1971)

Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate.

FEBS letters, 12, 267-268.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1975)

Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum.

Nature, Lond., 253, 97-101.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1977 a)

A large birefringence signal preceding contraction in single twitch fibres of the frog.

J. Physiol., Lond., 264, 141-162.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1977 b)

The optical properties of birefringence signals from single muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 264, 163-198.

BAYLOR, S.M. & OETLIKER, H. (1977 c)

Birefringence signals from surface and T-system membranes of frog single muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 264, 199-213.

BEELEER, T. & MARTONOSI, A. (1979)

The relationship between membrane potential and Ca^{2+} fluxes in isolated sarcoplasmic reticulum vesicles.

FEBS Letters, 98, 173-176.

BEELEER, T., RUSSELL, J.T. & MARTONOSI, A. (1979)

Optical probe responses on sarcoplasmic reticulum : exacorbocyanines as probes of membrane potential.

Eur. J. Biochem., 95, 579-591.

BERMAN, M.C. (1982)

Energy coupling and uncoupling of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum membranes.

Biochim. Biophys. Acta, 694, 95-121.

BEST, P.M. & ABRAMCHEK, C.W. (1985)

The metallochromic indicator dye Arsenazo III forms 1:1 complexes with caffeine.

Biochim. Biophys. Acta, 838, 179-182.

BEZANILLA, F. & HOROWICZ, P. (1975)

Fluorescence intensity changes associated with contractile activation in frog muscle with nile blue A.

J. Physiol., Lond., 246, 709-735.

BIANCHI, C.P. (1961)

The effect of caffeine on radiocalcium movement in frog sartorius.

J. gen. Physiol., 44, 845-858.

BIANCHI, C.P. (1962)

Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog sartorius.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 138, 41-48.

BIANCHI, C.P. (1968)

Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle.
Fed. Proc., 27, 126-131.

BIANCHI, C.P., (1969)

Pharmacology of excitation-contraction coupling in muscle.
Federation Proc., 28, 1624-1627.

BIRKS, R.I. & DAVEY, D.F. (1969)

Osmotic responses demonstrating the extracellular character of the sarcoplasmic reticulum.
J. Physiol., Lond., 202, 171-188.

BITTAR, E.E. (1971)

*The Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Cl⁻ composition of giant fibres from *Balanus nubilus*.*
Experientia, 27, 793-794.

BRADY, G.W., FEIN, D.B. & HARDER, M.E. (1982)

Liquid diffraction analysis of sarcoplasmic reticulum. II Solvent electron contrast variation.
Biophys. J., 37, 637-645.

BRANDT, P.W., REUBEN, J.P., GIRARDIER, L. & GRUNDFEST, H. (1965)

Correlated morphological and physiological studies on isolated single muscle fibers : I. Fine structure of the crayfish muscle fiber.
J. Cell. Biol., 25, 233-260.

BRANDT, P.W., REUBEN, J.P. & GRUNDFEST, H. (1972)

Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. II. Role of calcium.
J. gen. Physiol., 59, 305-317.

BRANDT, P.W., SORENSON, M.M., ORENTLICHER, M. & REUBEN, J.P. (1974).

Ca and substrate sensitivity of skinned crayfish fibers as a function of ionic concentration and ionic strength.

Fed. Proc., 33, 383.

BRANDT, P.W., COX, R.N. & KAWAI, M. (1980).

Can the binding of Ca^{2+} to two regulatory sites on troponin C determine the steep pCa/tension relationship of skeletal muscle ?

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77, 4717-4720.

BRANDT, P.W., COX, R.N., KAWAI, M. & ROBINSON, T. (1982).

Regulation of tension in skinned muscle fibers. Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca^{2+} sensitivity.

J. gen. Physiol., 79, 997-1016.

BREMEL, R.D. & WEBER, A. (1972)

Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle.

Nature New Biology, 238, 97-101.

BRIGGS, F.N., POLAND, J.L. & SOLARO, R.J. (1977).

Relative capabilities of sarcoplasmic reticulum in fast and slow mammalian skeletal muscles.

J. Physiol., Lond., 266, 587-594.

C

CAPUTO, C. & DIPOLO, R. (1978)

Contractile activity phenomena in voltage-clamped barnacle muscle fiber.

J. gen. Physiol., 71, 467-488.

CECCHI, G., GRIFFITHS, P.J. & TAYLOR, S.R. (1981).

High-frequency stiffness measurements of isolated frog skeletal muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 324, 22-23 P.

- CECCHI, G., GRIFFITHS, P.J. & TAYLOR, S. (1982)
Muscular contraction : kinetics of crossbridge attachment studied by high frequency stiffness measurements.
Science, 217, 70-72.
- CHAEN, S., KOMETANI, K., YAMADA, T. & SHIMIZU, H. (1981)
Substrate-concentration dependence of tension, shortening velocity and ATPase activity of glycerinated muscle fibres.
J. Biochem., 90, 1611-1621.
- CHAEN, S. & SUGI, H. (1982)
Substrate concentration dependence of contraction characteristics in glycerinated horseshoe crab skeletal muscle fibres.
Comp. Biochem. Physiol., 72A, 623-626.
- CHANDLER, W.K., RAKOWSKI, R.F. & SCHNEIDER, M.F. (1976)
Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle.
J. Physiol., Lond., 254, 285-316.
- CHIARANDINI, D.J., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. & GRUNDFEST, H. (1970)
Effects of caffeine on crayfish muscle fibers. I. Activation of contraction and induction of Ca spike electrogenesis.
J. gen. Physiol., 55, 640-664.
- CHIESI, M. (1984)
Cross-linking agents induce rapid calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.
Biochemistry, U.S.A., 23, 3899-3907.
- CHIESI, M., HO, M.M., INESI, G., SOMLYO, A.V. & SOMLYO, A.P. (1981)
Primary role of sarcoplasmic reticulum in phasic contractile activation of cardiac myocytes with shunted myolemma.
J. Cell. Biol., 91, 728-742.

COGNARD, C. & RAYMOND, G. (1985)

The strontium-induced calcium release process and its implication in contractility of skeletal muscle of Rana ridibunda.

Proc. R. Soc. Lond., 224, 489-509.

CORNELIUS, F. (1982)

Tonic contraction and the control of relaxation in a chemically skinned molluscan smooth muscle.

J. gen. Physiol., 79, 821-834.

COSTANTIN, L.L., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PODOLSKY, R. (1964)

Localization of calcium accumulating structures in striated muscle fibers.

Science, 147, 158-159.

COSTANTIN, L.L. & PODOLSKY, R.J. (1967)

Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle.

J. gen. Physiol., 50, 1101-1124.

CRANK, J. (1975)

The mathematics of diffusion.

Second edition. Clarendon Press, Oxford, 414 p.

D

DE LUCA, H.F. & ENGSTROM, G.W. (1961)

Calcium uptake by rat kidney mitochondria.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47, 1744-1750.

DHALIA, N.S., SULAKHE, P.V., LAMERS, J.M.J. & GANGULY, P.K. (1983).

Characterization of Ca²⁺ release from the cardiac sarcoplasmic reticulum.

Gen. Physiol. Biophys., 2, 339-351.

DONALDSON, S.R. & KERRICK, W.G. (1975)

Characterization of the effects of Mg^{2+} on Ca^{2+} and Sr^{2+} activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers.

J. gen. Physiol., 66, 427-444.

DUX, L. & MARTONOSI, A. (1983 a)

The regulation of ATPase-ATPase interactions in sarcoplasmic reticulum membrane. I. The effects of Ca^{2+} , ATP and inorganic phosphate.

J. Biol. Chem., 258, 11896-11902.

DUX, L. & MARTONOSI, A. (1983 b)

The regulation of ATPase-ATPase interaction in sarcoplasmic reticulum membrane. II. The influence of membrane potential.

J. Biol. Chem., 258, 11903-11907.

E

EAGLES, D.A. & RIORDAN, G.P. (1980)

The occurrence of dyads between both Z and T tubules and sarcoplasmic reticulum in the region of overlap of thick and thin myofilaments in horseshoe crab muscle.

Trans. Amer. Microsc. Soc., 99, 78-93.

EASTWOOD, A.B., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PERACCHIA, C. (1982)

Structure of the membrane in crayfish muscle : comparison of phasic and tonic fibres.

J. Muscle Res. and Cell. Mot., 3, 273-294.

EBASHI, S. & ENDO, M. (1968)

Calcium and muscle contraction.

In Progress in Biophysics and Molecular Biology, 18, 123-183.

EBASHI, S., KODOMA, A. & EBASHI, F. (1968)

Troponin 1. Preparation and physiological function.

J. Biochem., 64, 465-477.

EBASHI, S. & LIPMANN, F. (1962)

Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle.

J. Cell. Biol., 14, 389-400.

EDWARDS, C., LORKOVIC, K. & WEBER, A. (1966)

The effect of the replacement of calcium by strontium on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle.

J. Physiol., Lond., 186, 295-306.

EISENBERG, B.R. & EISENBERG, R.S. (1982)

The T-SR junction in contracting single skeletal muscle fibers.

J. gen. Physiol., 79, 1-9.

EKELUND, M.C. & EDMAN, K.A.P. (1982)

Shortening induced deactivation of skinned fibres of frog and mouse striated muscle.

Acta Physiol. Scand., 116, 189-199.

ENDO, M. (1972)

Stretch-induced increase in activation of skinned muscle fibres by calcium.

Nature new Biol., 237, 211-213.

ENDO, M. (1975)

Conditions required for calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.

Proc. Japan Acad., 51, 467-472.

ENDO, M. (1977)

Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.

Physiol. Rev., 57, 71-108.

ENDO, M. (1981)

Mechanism of calcium induced calcium release in the SR membrane.

In The Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes,
OHNISHI, S.T. & ENDO, M. Eds, pp 257-264, New York Academic.

ENDO, M. & KITAZAWA, T. (1976)

The effect of ATP on calcium release mechanisms in the sarcoplasmic reticulum of skinned muscle fibers.

Proc. Japan, Acad., 52, 595-598.

ENDO, M. & NAKAJIMA, Y. (1973)

Release of calcium induced by "depolarization" of the sarcoplasmic reticulum.

Nature new Biol., 246, 216-218.

ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. (1970)

Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres.

Nature, Lond., 228, 34-36.

ENDO, M., YAGI, S. & IINO, M. (1982)

Tension-pCa relation and sarcoplasmic reticulum responses in chemically skinned smooth muscle fibers.

Federation Proceedings, 41, 2245-2250.

ENTMAN, M.L., BORNET, E.P. & SCHWARTZ, A. (1972)

Phasic components of calcium binding and release by canine cardiac relaxing system (sarcoplasmic reticulum fragments).

J. Mol. Cell. Cardiol., 4, 155-169.

F

FABIATO, A. (1981)

Mechanism of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells studied with potential-sensitive dyes.

In the mechanism of gated calcium transport across biological membranes.
Edited by S.T. Ohnishi and M. Endo. Academic Press, New-York, pp. 237-255.

FABIATO, A. (1982)

Fluorescence and differential light absorption recordings with calcium probes and potential-sensitive dyes in skinned cardiac cells.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 60, 556-567.

FABIATO, A. (1983)

Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.

Am. J. Physiol., 245, C₁-C₁₄.

FABIATO, A. (1985 a)

Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned cardiac purkinje cell.

J. gen. Physiol., 85, 189-246.

FABIATO, A. (1985 b)

Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell.

J. gen. Physiol., 85, 247-289.

FABIATO, A. (1985 c)

Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell.

J. gen. Physiol., 85, 291-320.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1972)

Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium dependent cyclic and tonic contractions.

Circ. Res., 31, 293-307.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1975 a)

Contractions induced by a calcium triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.

J. Physiol., Lond., 249, 469-495.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1975 b).

Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells.

J. Physiol., 249, 497-517.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1977)

Variations of the membrane potential of the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscle detected with a potential-sensitive dye.

J. gen. Physiol., 70, 6 a.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 a)

Optical recordings during Ca^{2+} accumulation in and release from the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal and cardiac muscle cells stained with a potential-sensitive dye or with chlorotetracycline.

Proceedings of the 6th International Biophysical Congress. September 3-9. Kyoto, Japan, p. 233 (Abstr.).

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 b)

Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat and frog heart and from fetal and new-born rat ventricles.

Ann. New-York Acad Sciences, 307, 491-522.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 c).

Cyclic AMP-induced enhancement of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum with no modification of the sensitivity of the myofilaments to calcium in skinned fibres from a fast skeletal muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 539, 253-260.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 d).

Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.
J. Physiol., Lond., 276, 233-255.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978 e).

Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells.
J. gen. Physiol., 72, 667-699.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1979)

Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells.
J. Physiol., Paris, 75, 463-505.

FATT, P. & GINSBORG, B.L. (1958)

The ionic requirements for the production of actions potentials in crustacean muscle fibres.
J. Physiol., Lond., 142, 516-543.

FATT, P. & KATZ, B. (1953)

The electrical properties of crustacean muscle fibres.
J. Physiol., Lond., 120, 171-204.

FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1968)

Force development and calcium movements in skinned muscle fibers.
Federation Proceedings, 27, 375.

- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1970)
Regenerative calcium release within muscle cells.
Science, 167, 58-59.
- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. (1972)
Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA buffered solutions.
J. Physiol. (Lond.), 223, 1-19.
- FRANK, G.B. (1960)
Effect of changes in extracellular calcium concentration on the potassium induced contracture of frog's skeletal muscle.
J. Physiol., Lond., 151: 518-538.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1966)
Variations in the length of crab myofilaments.
J. Physiol., Lond., 186, 25 P.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970)
Studies of the triad structure of the junction in frog twitch fibers.
J. Cell. Biol., 47, 488-499.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & NUNZI, G. (1983)
Junctional feet and particles in the triads of a fast twitch muscle fibre.
J. Muscle Res. and Cell. Motility, 4, 233-252.
- FUCHS, F. & BAYUK, M. (1976)
Cooperative binding of calcium to glycerinated skeletal muscle fibers.
Biochim. Biophys. Acta, 440, 448-455.

G

GALVANI, L. (1791)

Le Viribus electricitatis in motu musculari commentarius.
Istituto Scienze orti liberali Bologno, 7, 363-418.

GARCIA, A.M. & MILLER, C. (1984)

Channel-mediated monovalent cation fluxes in isolated sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. gen. Physiol., 83, 819-839.

GILLIS, J.M. (1967)

Contraction of isolated crab myofibrils bu local application of calcium ions.
J. Physiol., Londres. 191, 103 P - 104 P:

GILLIS, J.M. (1985)

Relaxation of vertebrate skeletal muscle. A synthesis of the biochemical and physiological approaches.
Biochim. Biophys. Acta, 811, 97-145.

GOBLET, C. (1979)

Etude de l'activité mécanique des fibres musculaires de crabe en relation avec les courants ioniques membranaires et le potentiel de membrane.
Thèse de 3ème cycle, Lille, 216 p.

GOBLET, C., HOLY, X. & MOUNIER, Y. (1984)

Intramuscular calcium movements : experiments from the soviet biosatellite biocosmos.
Adv. Space Res., 4, 47-53.

GOBLET, C. & MOUNIER, Y. (1981)

Effects of ryanodine on the ionic currents and the calcium conductance in crab muscle fibers.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 219, 526-533.

GOBLET, C. & MOUNIER, Y. (1982)

Contractility in relation with excitability in voltage-clamped crab muscle fibres : evidence for two components of tension.
Gen. Physiol. Bionhys., 1, 233-253.

GOBLET, C. & MOUNIER, Y. (1986)

Calcium-induced calcium release mechanism from the sarcoplasmic reticulum in skinned crab muscle fibres.
Cell Calcium, sous presse.

GODT, R.E. (1974)

Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog dependence on magnesium adenosine triphosphate concentration.
J. gen. Physiol., 63, 722-739.

GODT, R.E. & LINDLEY, B.D. (1982)

Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog.
J. gen. Physiol., 80, 279-297.

GORDON, A.M., HUXLEY, A.F. & JULIAN, F.J. (1966)

The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres.
J. Physiol., Lond., 184, 170-192.

GULATI, J. & PODOLSKY, R.J. (1978)

Contraction transients of skinned muscle fibers : effects of calcium and ionic strength.
J. gen. Physiol., 72, 701-715.

H

HAGIWARA, S., FUKUDA, J. & EATON, D.C. (1974)

Membrane currents carried by Ca, Sr and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp.
J. gen. Physiol., 63, 564-578.

HAGIWARA, S., HAYASHI, H. & TAKAHASHI, K. (1969)

Calcium and potassium currents of the membrane of a barnacle muscle fibre in relation to the calcium spike.

J. Physiol., Lond., 205, 115-129.

HAGIWARA, S. & NAKA, K.I. (1964)

The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low internal Ca⁺⁺.

J. gen. Physiol., 48, 141-162.

HAGIWARA, S. & NAKAJIMA, S. (1966)

Effects of the intracellular calcium ion concentration upon the excitability of the muscle fiber membrane of a barnacle.

J. gen. Physiol., 49, 807-818.

HAGIWARA, S., TAKANASHI, K. & JUNGE, D. (1968)

Excitation-contraction coupling in a barnacle muscle fiber as examined with voltage-clamp technique.

J. gen. Physiol., 51, 157-175.

HASSELBACH, W. (1964)

Relaxation and the sarcotubular calcium pump.

Fed. Proc., 23, 909-912.

HASSELBACH, W. (1981)

Calcium-activated ATPase of the sarcoplasmic reticulum membranes.

In Membrane transport Bonting, de Pont (eds). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Chapter 7, 183-207.

HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. (1961)

Die calcium pumpe der "erschlauffungsgrana" des muskels und ihre abhängigigkeit von der ATP Spaltung.

Biochem. Z., 333, 518-528.

HASSELBACH, W. & OETLIKER, H. (1983)

Energetics and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump.

Ann. Rev. Physiol., 45, 325-329.

HEILBRUNN, L.V. & WIERCINSKI, F.J. (1947)

The action of various cations on muscle protoplasm.

J. cell. comp. Physiol., 29, 15-32.

HELLAM, D.C. & PODOLSKY, R.J. (1969)

Force measurements in skinned muscle fibres.

J. physiol., Lond., 200, 807-819.

HENČEK, M. & ZACHAR, J. (1977)

Calcium currents and conductances in the muscle membrane of the crayfish.

J. Physiol., Lond., 268, 51-71.

HERZIG, J.W. (1984)

Contractile proteins : possible targets for drug action.

Trends in Pharmacological Sciences, 5, 296-300.

HERZIG, J.W., YAMAMOTO, T. & RÜEGG, J.C. (1981)

Dependence of force and immediate stiffness on sarcomere length and Ca^{2+} activation in frog skinned muscle fibres.

Pflügers Arch., 389, 97-103.

HILL, T.L. & INESI, G. (1982)

Equilibrium cooperative binding of calcium and protons by sarcoplasmic reticulum ATPase.

Proc. Natl. Acad. Sci USA, 79, 3978-3982.

HORAČKOVA, M. & VASSORT, G. (1979)

Na-Ca exchange in regulation of cardiac contractility : evidence for electrogenic, voltage-dependent mechanism.

J. gen. Physiol., 73, 403-424.

HOYLE, G. (1983)

Muscles and their neural control.
New-York. WILEY ed.

HOYLE, G., MC NEILL, P.A. & SELVERSTON, A.I. (1973)

Ultrastructure of barnacle giant muscle fibers.
J. cell. Biol., 56, 74-91.

HOYLE, G. & SMYTH, T. (1963)

Giant muscle fibers in a barnacle, Balanus nubilus (Darwin).
Science, 139, 49.

HUXLEY, A.F. (1957)

Muscle structure and theories of contractions.
Prog. Biophys., 7, 255-318.

HUXLEY, H. & HANSON, J. (1954)

Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation.
Nature, 173, 973-976.

HUXLEY, A.F. & NIEDERGERKE, R. (1954)

Structural changes in muscle during contractions. Interference microscopy of living muscle fibres.
Nature, Lond., 173, 971-973.

HUXLEY, A.F. & SIMMONS, R.M. (1973)

Mechanical transients and the origin of muscular force.
Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 37, 669-680.

I

IKEMOTO, N. (1975)

Transport and inhibitory Ca^{2+} binding sites on the ATPase enzyme isolated from the sarcoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem., 250, 7219-7224.

IKEMOTO, N., ANTONIU, B. & KIM, D.H. (1984)

Rapid calcium release from the isolated sarcoplasmic reticulum is triggered via the attached transverse tubular system.

J. Biol. Chem., 259, 13151-13158.

INESI, G. (1971)

p-Nitrophenylphosphate hydrolysis and calcium ion transport in fragmented sarcoplasmic reticulum.

Science, 171, 901-903.

INESI, G. (1972)

Active transport of calcium ion in sarcoplasmic reticulum.

Ann. Rev. Biophys. Bioengineering, 1, 191-210.

INESI, G. & SCARPA, A. (1972)

Fast kinetics of adenosine triphosphate dependent Ca^{2+} uptake by fragmented sarcoplasmic reticulum.

Biochemistry, 11, 356-359.

INESI, G. (1979)

In Membrane Transport in Biology Giebisch, Tosteson et Ussing (eds). Springer Verlag, Heidelberg, Vol. 2, 357-393.

INESI, G. & HILL, T.L. (1983)

Calcium and proton dependence of sarcoplasmic reticulum ATPase.

J. Biophys., 44, 271-280.

J

JILKÁ, R.L., MARTONOSI, A. & TILLACH, T.W. (1975)

Effect of the purified $[Mg^{2+}+Ca^{2+}]$ - activated ATPase of sarcoplasmic reticulum upon the passive Ca^{2+} permeability and ultrastructure of phospholipid vesicles.

J. Biol. Chem., 250, 7511-7524.

JÖBSIS, F.F. & O'CONNOR, M. (1966)

Calcium release and reabsorption in the sartorius muscle of the Toad.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 246-252.

JOHNSON, J.D., CHARLTON, S.C. & POTTER, J.D. (1979).

A fluorescence stopped flow analysis of Ca^{2+} exchange with troponin C.

J. Biol. Chem., 254, 3497-3502.

JULIAN, F.J. (1972)

The effect of calcium on the force-velocity relation of briefly glycerinated frog muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 218, 117-145.

K

KALBITZER, H.R., STEHLIK, D. & HASSELBACH, W. (1978)

The binding of calcium and magnesium to sarcoplasmic reticulum vesicles as studied by manganese electron paramagnetic resonance.

Eur. J. Biochem., 82, 245-255.

KASAI, M. & MIYAMOTO, H. (1976)

Depolarization induced Ca release from sarcoplasmic reticulum fragments.

I. Release of calcium taken up upon using ATP.

J. Biochem., 79, 1053-1066.

KATZ, A.M., DUNNETT, J., REPKE, D.I. & HASSELBACH, W. (1976).

Control of calcium permeability in the sarcoplasmic reticulum.

FEBS Lett., 67, 207-208.

- KATZ, A.M., REPKE, D.I., DUNNETT, J. & HASSELBACH, W. (1977).
Dependence of calcium permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations.
J. Biol. Chem., 252, 1950-1966.
- KATZ, G.M., GOBLET, C. & REUBEN, J.P. (1981)
A photometric method for determining active and passive uptake and release of Ca from single skinned fibres.
Biophys. J., 33, 285a.
- KAWAI, M. & BRANDT, P.W. (1976)
Two rigor states in skinned crayfish single muscle fibers.
J. gen. Physiol., 68, 267-280.
- KAWAI, M. & BRANDT, P.W. (1977)
Effect of MgATP on stiffness measured at two frequencies in Ca²⁺-activated muscle fibers.
Proc. natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 4073-4075.
- KILB, H. & STAMPFLI, R. (1955)
Ein Viel weghahn zur raschen Umschaltung auf Verschiedene Durchströmungsflüssigkeiten.
Helv. Physiol. Acta, 13, 191-194.
- KIM, D.H., OHNISHI, S.T. & IKEMOTO, N. (1983)
Kinetic studies of calcium release from sarcoplasmic reticulum in vitro.
J. Biol. Chem., 258, 9662-9668.
- KIMURA, M. & TAWADA, K. (1984)
Is the S II portion of the cross-bridges in glucerinated rabbit psoas fibers compliant in the rigor state.
Biophys. J., 45, 603-610.
- KIRCHBERGER, M.A. & WONG, D. (1978)
Calcium efflux from isolated cardiac sarcoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem., 253, 6941-6945.

KIRINO, Y. & SHIMIZU, H. (1982)

Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from fragmented sarcoplasmic reticulum : a comparison with skinned muscle fiber studies.

J. Biochem., 92, 1287-1296.

KOMETANI, T. & KASAI, M. (1978)

Ionic permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles measured by light scattering method.

J. Membrane Biol., 41, 295-308.

KOSHITA, M. & HOTTA, K. (1981)

Relationship between membrane potential and calcium ion fluxes in the fragmented sarcoplasmic reticulum.

Jap. J. Physiol., 31, 109-120.

KOSHITA, M., YAMAMOTO, M. & HOTTA, K. (1982)

Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum vesicles derived from longitudinal reticulum and terminal cisternae of frog skeletal muscles.

J. Biochem., 92, 1103-1108.

KUSHMERICK, M.J. et PODOLSKY, R.J. (1969)

Ionic mobility in muscle cells.

Science, Wash. D.C., 166, 1297-1298.

L

LECONTE, L. (1985)

Mouvements intramusculaires de calcium en présence d'un inhibiteur des flux potassiques : le TEA.

Diplôme d'Etudes Approfondies, Lille, 85 p.

LEHMAN, W. (1977)

Ca ion dependent myosin from decapod crustacean muscle.

Biochem. J., 163, 291.

- LEHMAN, W. & SZENT-GYÖRGI, A.G. (1975)
Regulation of muscular contraction distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom.
J. gen. Physiol., 66, 1-30.
- LEVY, R.M., UMAZUME, Y. & KUSHMERIC, M.J. (1976)
 Ca^{2+} dependence of tension and ADP production in segments of chemically skinned muscle fibers.
Biochim. Biophys. Acta, 430, 352-365.
- LOWEY, S., SLAYTER, H.S., WEEDS, A.G. & BAKER, H. (1969).
Substructure of the myosin molecule I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation.
J. Mol. Biol., 42, 1-29.
- LÜDI, H. & HASSELBACH, W. (1985)
Preparation of a highly concentrated, completely monomeric, active sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.
Biochim. Biophys Acta, 821, 137-141.
- LUFF, A.R. & ATWOOD, H.L. (1971)
Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of fast and slow skeletal muscles of the mouse during postnatal development.
J. Cell. Biol., 51, 369-383.
- LÜTTGAU, H.C. & OETLIKER, H. (1968)
The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres.
J. Physiol., Lond., 194, 51-74.
- M
- MAC LENNAN, D.H. & WONG, P.T.S. (1971)
Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum.
Proc. Natl. Acad. Sci., 68, 1231-1235.

MAC COLLUM, W.B., BESCH, H.R. Jr., ENTMAN, M.L. & SCHWARTZ, A. (1972)

Apparent initial binding rate of calcium by canine cardiac-relaxing system.

Amer. J. Physiol., 223, 608-614.

MADEIRA, V.M.C. (1975)

A rapid and ultrasensitive method to measure Ca^{++} movements across biological membranes.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 870-876.

MADEIRA, V.M.C. (1978)

Proton gradient formation during transport of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum.

Arch. Biochem. and Biophys., 185, 316-325.

MAKINOSE, M. & HASSELBACH, W. (1971)

ATP synthesis by the reverse of the sarcoplasmic calcium pump.

FEBS Lett., 12, 271-272.

MARTONOSI, A. (1964)

Role of phospholipids in ATPase activity and Ca transport of fragmented sarcoplasmic reticulum.

Federation Proc., 23, 913-921.

MARTONOSI, A.N. (1984)

Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.

Physiol. Rev., 64, 1240-1320.

MATSUMURA, M. (1972)

The effects of metal ions and caffeine on electromechanical coupling in crayfish muscle fibers.

Jap. J. Physiol., 22, 71-85.

MEISSNER, G. (1975)

Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles.

Biochim. Biophys. Acta, 389, 51-68.

MEISSNER, G. & Mc KINDLEY, D. (1976)

Permeability of sarcoplasmic reticulum membrane. The effect of changed ionic environments on Ca release.

J. Membrane Biol., 30, 80-99.

MÉSZAROS, L.G. & IKEMOTO, N. (1985)

Ruthenium red and caffeine affect the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 127, 836-842.

MILLER, C. (1978)

Voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum : steady-state electrical properties.

J. Membr. Biol., 40, 1-23.

MILLER, C. & ROSENBERG, R.L. (1979)

Modification of a voltage-gated K^+ channel from sarcoplasmic reticulum by a pronase-derived specific endopeptidase.

J. gen. Physiol., 74, 457-478.

MILLER, D.J. & THIELECZEK, R. (1977)

Calcium release by caffeine and other methylxanthines in skinned skeletal muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 273, 67-68 P.

MIYAMOTO, H. & RACKER, E. (1981)

Calcium-induced calcium release at terminal cisternae of skeletal sarcoplasmic reticulum.

FEBS Lett., 133, 235-238.

MOUNIER, Y. (1970)

Conductances ioniques membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe.

Thèse de 3ème cycle, Lille.

MOUNIER, Y. (1975)

Analyse, en potentiel imposé, de l'activité électrique des fibres musculaires de crabe. Interprétation des potentiels d'action gradués. Thèse d'état, Lille, 337 p.

MOUNIER, Y. & GOBLET, C. (1983)

Calcium permeability of sarcoplasmic reticulum in human muscle fibres. In "Space Physiology", Cepadues ed., 299-305.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1973)

Analyse en potentiel imposé des courants membranaires de la fibre musculaire de crabe. C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 276, 173-176.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975 a)

Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage-clamp conditions. J. Physiol., Lond., 251, 589-608.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1975 b)

Evidence for a transient potassium membrane current dependent on calcium influx in crab muscle fibre. J. Physiol., Lond., 251, 609-625.

MOUNIER, Y. & VASSORT, G. (1979)

Is there a voltage-dependent Cl conductance or do Cl ions modify other conductances in crab muscle fibre? J. Physiol., Paris, 75, 861-871.

MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1978)

Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution. J. Physiol., Lond., 275, 241-262.

MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1979)

Sarcomere length effects on the Sr^{2+} - and Ca^{2+} - activation curves in skinned frog muscle fibres.

Biochem. Biophys. Acta, 546, 64-76.

MULLINS, L.J. & BRINLEY, F. J. Jr (1975)

Sensitivity of calcium efflux from squid axons to changes in membrane potential.

J. gen. Physiol., 65, 135-152.

NAGAI, T., TAKAHASHI, H. & TAKAUJI, M. (1965)

On the accumulation of divalent cations by skeletal muscle microsomes.

In Molecular Biology of Muscular Contraction. EBASHI, S., OOSAWA, F., SEKINE, T. & TONOMURA, Y. eds. Elsevier-North Holland, Amsterdam,

9, 169-176.

NAGASAKI, K. & KASAI, M. (1981)

Calcium-induced calcium release from the sarcoplasmic reticulum vesicles.

J. Biochem., 90, 749-755.

NAGASAKI, K. et KASAI, M. (1984)

Channel selectivity and gating specificity of calcium-induced calcium release channel in isolated sarcoplasmic reticulum.

J. Biochem., 96, 1769-1775.

NANNINGA, L.B. (1961)

Calculation of free magnesium, calcium and potassium in muscle.

Biochim. Biophys. Acta, 54, 338-344.

NATORI, R. (1954)

The property and contraction process of isolated myofibrils.

Jikeikai Med. J., 1, 119-126.

NIEDERGERKE, R. & PAGE, S. (1981)

Analysis of caffeine action in single trabeculae of the frog heart.
*Proc. of the Roy. Soc. B*213, 303-324.

0

OHNISHI, S.T. (1979)

Calcium induced calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum.
J. Biochem., 86, 1147-1150.

ORENTLICHER, M., BRANDT, P.W. & REUBEN, J.P. (1977)

Regulation of tension in skinned muscle fibers : effect of high concentrations of Mg-ATP.
Am. J. Physiol., 233, C127-C134.

ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H. & BRANDT, P.W. (1974)

Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibers.
J. gen. Physiol., 63, 168-186.

P

PAGE, E. & PAGE, E. (1968)

Distribution of ions and water between tissue compartments in the perfused left ventricle of the rat heart.
Circulation Res., 22, 435-446.

PAGE, E. & POLIMENI, P. (1972)

Magnesium exchange in rat ventricle.
J. Physiol., 224, 121-139.

PEACHEY, L.D. (1967)

Membrane properties of crab fibers.

Am. Zoologist, 7, 505-513.

PEACHEY, L.D. & HUXLEY, A.F. (1964)

Transverse tubules in crab muscle.

J. Cell. Biol., 23, 2, 70 A.

PFITZER, G., PETERSON, J.W. & RÜEGG, J.C. (1982)

Length dependence of calcium activated isometric force and immediate stiffness in living and glycerol extracted vascular smooth muscle.

Pflügers Arch., 394, 174-181.

PICK, U. & BASSILIAN, S. (1983)

The effects of ADP, phosphate and arsenate on Ca efflux from sarcoplasmic reticulum vesicles.

Eur. J. Biochem., 131, 393-399.

PODOLSKY, R.J. & TEICHHOLZ, L.E. (1970)

The relation between calcium and contraction kinetics in skinned muscle fibres.

J. Physiol., Lond., 211, 19-35.

POLEDNA, J. & MORAD, M. (1983)

Effect of caffeine on the birefringence signal in single skeletal muscle fibers and mammalian heart possible mechanism of action.

Pflügers Arch., 397, 184-189.

POLLACK, G.H. (1983)

The cross-bridge theory.

Physiol. Rev., 63, 1049-1113.

PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C. & RÜEGG, J.C. (1964)

The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab Maia squinado on the internal concentration of free calcium ions.

Biochim. Biophys. Acta, 79, 581-591.

POTTER, J.D. & GERGELY, J. (1974)

Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca regulation of muscle contraction.

Biochemistry, 13, 2697-2703.

POTTER, J.D. & GERGELY, J. (1975)

The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase.

R

REUBEN, J.P. (1982)

Calcium and tension regulation in skinned skeletal muscle fibers.

Federation Proc., 41, 2225-2231.

REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. & GRUNDFEST, H. (1967)

Tension evoked in skinned crayfish muscle fibers by anions, pH and drugs.

J. gen. Physiol., 50, 2501.

REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., BERMAN, M. & GRUNDFEST, H. (1971)

Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. I. Contraction and relaxation in the absence of Ca (pCa > 9).

J. gen. Physiol., 57, 385-407.

REUBEN, J.P., WOOD, D.S. & EASTWOOD, A.N. (1977)

Adaptation of single fiber techniques for the study of human muscle.

In Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, ROWLAND L.P. Ed.,

Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 259-269.

RIDGWAY, E.B. & ASHLEY, C.D. (1967)

Calcium transients in single muscle fibers.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 229-234.

RIDGWAY, E.B., GORDON, A.M. & MARTYN, D.A. (1983)

Hysteresis in the force-calcium relation in muscle.

Science, 219, 1075-1077.

RIDGWAY, E.B. & GORDON, A.M. (1984)

Muscle calcium transient. Effect of post-stimulus length changes in single fibers.

J. gen. Physiol., 83, 75-103.

ROUGIER, O. (1968)

Le potentiel d'action cardiaque : interprétation d'après les données du "voltage clamp".

Thèse d'état, Poitiers.

ROUGIER, O., VASSORT, G. & STÄMPFLI, R. (1968)

Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibres with the sucrose gap technique.

Pflügers Arch., 301, 91-108.

RÜEGG, J.C., KUHN, H.J., HERZIG, J.W. & DICKHAUS, H. (1975)

Effects of calcium ions on force generation and elastic properties of briefly glycerinated muscle fibers.

In Calcium Transport in Contraction and Secretion. E. CARAFOLI, ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

RUSSELL, J.M. & BLAUSTEIN, M.P. (1974)

Calcium efflux from barnacle muscle fibers.

Dependence on external cations.

J. gen. Physiol., 63, 144-167.

RUSSELL, J.T., BEELER, T. & MARTONOSI, A. (1979 a)

Optical probe responses on sarcoplasmic reticulum. Oxocarboxyanines.

J. Biol. Chem., 254, 2040-2046.

RUSSELL, J.T., BEELER, T. & MARTONOSI, A. (1979 b)

Optical probe responses on sarcoplasmic reticulum. Merocyanine and oxonol dyes.

J. Biol. Chem., 254, 2047-2052.

S

SAIDA, K. (1982)

Intracellular Ca release in skinned smooth muscle.

J. gen. Physiol., 80, 191-202.

SAIDA, K. & SUZUKI, A. (1981)

Effect of Mn²⁺ on the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal muscle fibers.

Japan. J. Pharmacol., 31, 1084-1086.

SAIDA, K. & VAN BREEMEN, C. (1983)

A possible Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism mediated by norepinephrine in vascular smooth muscle.

Pflügers Arch., 397, 166-167.

SALVIATI, G., SORENSON, M.M. & EASTWOOD, A.B. (1982)

Calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in two populations of chemically skinned human muscle fibers. Effects of calcium and cyclic AMP.

J. gen. Physiol., 79, 603-632.

SANDOW, A. (1965)

Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.

Pharmacological Rev., 17, 265-320.

SANDOW, A. & BRUST, M. (1966)

Caffeine potentiation of twitch tension in frog sartorius muscle.

Biochemische Zeitschrift, 345, 232-247.

SCARPA, A., BRINLEY, F.J., TIFFERT, T. & DUBYAK, G.R. (1978)

Metallochromic indicators of ionized calcium.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 307, 86-112.

SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. (1973)

Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation-contraction coupling.

Nature, 242, 244-246.

SCHUURMANS-STEKHOVEN, F. & BONTING, S.L. (1981)

Transport adenosine triphosphotases : properties and functions.

Physiol. Rev., 61, 1-76.

SCHWARZENBACH, G., SENN, H. & ANDEREGG, G. (1957)

Komplexone XXIX. Ein grosser Chelateffekt besonderer.

Art. Helv. Chim. Acta, 40, 1886-1900.

SELVERSTON, A. (1967)

Structure and function of the transverse tubular system in crustacean muscle fibers.

Am. Zoologist, 7, 515-525.

SHAW, J. (1958)

Osmoregulation in the muscle fibres of Carcinus maenas.

J. exp. Biol., 35, 920-929.

SHEELER, P. & BIANCHI, D.E. (1980)

In Cell Biology : structure, biochemistry and function, John Wiley & Sons eds, New-York.

SHIGEKAWA, M., WAKABAYASHI, S. & NAKAMURA, H. (1983)

Reaction mechanism of Ca²⁺-dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. ATP hydrolysis with CaATP as a substrate and role of divalent cation.

J. Biol. Chem., 258, 8698-8707.

SHINER, J.S. & SOLARO, R.J. (1984)

The Hill coefficient for the Ca²⁺-activation of striated muscle contraction.

Biophys. J., 46, 541-543.

SHOSHAN, V., Mc LENNAN, D.H. & WOOD, D.S. (1983)

Tetraphenylboron causes Ca^{2+} release in isolated sarcoplasmic reticulum and in skinned muscle fibers.

J. Biol. Chem., 258, 2837-2842.

SOLARO, R.J., BRUNI, F.D. & GLEASON, E.N. (1976)

Effects of ionic strength on calcium binding to rabbit skeletal myofibrils, thin filaments and myosin.

Biochim. Biophys. Acta, 449, 304-309.

SOMLYO, A.P. & SOMLYO, A.V. (1971)

Strontium accumulation by sarcoplasmic reticulum and mitochondria in vascular smooth muscle.

Science, 174, 955-958.

SOMLYO, A.V., GONZALEZ-SERRATOS, H., SHUMAN, H., Mac LENNAN, G. & SOMLYO, A.P. (1981)

Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle : an electron-probe study.

J. Cell. Biol., 90, 577-594.

SORENSEN, M.M., REUBEN, J.P., EASTWOOD, A.B., ORENTLICHER, M. & KATZ, G.M. (1980)

Functional heterogeneity of the sarcoplasmic reticulum within sarcomeres of skinned muscle fibers.

J. Membrane Biol., 53, 1-17.

SPERELAKIS, N., VALLE, R., OROZCO, C., MARTINEZ, PALOMO, A. & RUBIO, R. (1973)

Electromechanical uncoupling of frog skeletal muscle by possible change in sarcoplasmic reticulum content.

Am. J. Physiol., 225, 793-800.

STÄMPFLI, R. (1954)

A new method for measuring membrane potentials with external electrodes.

Experientia, 10, 508-509.

STEPHENSON, D.G. & WILLIAMS, D.A. (1980)

Activation of skinned arthropod muscle fibres by Ca^{2+} and Sr^{2+} .

J. Muscle Research and Cell. Motility, 1, 73-87.

STEPHENSON, E.W. (1981)

Activation of fast skeletal muscle : contributions of studies on skinned fibers.

Am. J. Physiol., 240, C₁-C₁₉.

STEPHENSON, E.W. & PODOLSKY, R.J. (1977)

Regulation by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers.

J. gen. Physiol., 69, 1-16.

STINNAKRE, J. & TAUC, L. (1973)

Calcium influx in active Aplysia neurones detected by injected aequorin.

Nature New Biology, 242, 113-115.

SUAREZ-KURTZ, G. (1974)

Inhibition of membrane calcium activation by Neomycin and Streptomycin in crab muscle fibers.

Pflügers Arch., 349, 337-349.

SUAREZ-KURTZ, G., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. & GRUNDFEST, H. (1972)

Membrane calcium activation in excitation-contraction coupling.

J. gen. Physiol., 59, 676-688.

SUMIDA, M. & TONOMURA, Y. (1974)

Reaction mechanism of the Ca²⁺-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. X. Direct evidence for Ca²⁺ translocation coupled with formation of a phosphorylated intermediate.

J. Biochem., 75, 283-297.

SUTHERLAND, E.W. & RALL, T.W. (1958)

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.

J. Biol. Chem., 232, 1077-1083.

SUZUKI, S. & SUGI, H. (1983)

Extensibility of the myofilaments in vertebrate skeletal muscle as revealed by stretching rigor muscle fibers.

J. gen. Physiol., 81, 531-546.

T

TADA, M. & KATZ, A.M. (1982)

Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma.
Ann. Rev. Physiol., 44, 401-423.

TAKENAKA, H., ADLER, P.N. & KATZ, A.M. (1982)

Calcium fluxes across the membrane of sarcoplasmic reticulum vesicles.
J. Biol. Chem., 257, 12649-12656.

TASAKI, I. (1939)

The strength-duration relation of the normal polarized and narcotized nerve fibre.
Amer. J. Physiol., 125, 367-379.

TAWADA, K. & KIMURA, M. (1984)

Stiffness of glycerinated rabbit psoas fibers in the rigor state.
Filament-overlap relation.
Biophys. J., 45, 593-602.

TENU J.P., DUPAIX, A., YON, J., SEYDOUX, F.J. & CHEVALIER, J. (1978)

A possible model for calcium transport in sarcoplasmic reticulum.
Rev. Biol. Cell., 33, 219-224

THORENS, S. & ENDO, M. (1975)

Calcium-induced calcium release and depolarization-induced calcium release : their physiological significance.
Proc. Japan. Acad., 51, 473-478.

TOMKAVÁ, Z. & KONTSEKOVA, M. (1980)

The uptake of strontium ions by the sarcoplasmic reticulum of the crayfish.
Physiol. Bohemoslov., 29, 472-473.

V

VAN DER KLOOT, W.G. & GLOVSKY, J. (1965)

The uptake of Ca^{2+} and Sr^{2+} by fractions from lobster muscle.
Comp. Biochem. Physiol., 15, 547-565.

VANDERKOOI, J.M., JEROKOMAS, A., NAKAMURA, H. & MARTONOSI, A. (1977)

Fluorescence energy transfer between Ca^{2+} transfer ATPase molecule in artificial membranes.
Biochemistry, 16, 1262-1267.

VASINGTON, F.D. & MURPHY, J.V. (1962)

Ca uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation.
J. Biol. Chem., 237, 2670-2677.

VAUGHAN-JONES, R.D. (1977)

The effect of lowering external sodium on the extracellular sodium activity of crab muscle fibres.
J. Physiol., Lond., 264, 239-265.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. & INESI, G. (1979)

Rapid kinetics of calcium ion transport and ATPase activity in the sarcoplasmic reticulum of dystrophic muscle.
Biochim. Biophys. Acta, 558, 119-125.

W

WEBER, A. (1966)

Energized calcium transport and relaxing factors.
In Current Topics in Bioenergetics, 1, 203-254.

WEBER, A. (1968)

The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic reticulum.
J. gen. Physiol., 52, 760-772.

WEBER, A. (1971)

Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum. I - The effect of accumulated calcium on transport and adenosine triphosphate hydrolysis.

J. gen. Physiol., 57, 50-63.

WEBER, A. et HERZ, R. (1963)

The binding of calcium to actomyosin systems in relation to their biological function.

J. Biol. Chem., 238, 599-605.

WEBER, A. & HERZ, R. (1968)

The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum.

J. gen. Physiol., 52, 750-759.

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. (1966)

Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented reticulum.

Biochem. Z., 345, 329-369.

WENDT, I.R. & STEPHENSON, D.G. (1983)

Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibres of the Rat.

Pflügers Arch., 398, 210-216.

WINEGRAD, S. (1968)

Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus.

J. gen. Physiol., 51, 65-83.

WINEGRAD, S. (1971)

Studies of cardiac muscle with a high permeability to calcium produced by treatment with ethylenediamine-tetraacetic acid.

J. gen. Physiol., 58, 71-93.

WINEGRAD, S. (1982)

Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum.

Ann. Rev. Physiol., 44, 451-462.

WOOD, D.S. (1978)

Human skeletal muscle : analysis of Ca^{2+} regulation in skinned fibers using caffeine.

Experimental Neurology, 58, 218-230.

WOOD, D.S., ZOLLMAN, J., REUBEN, J.P. & BRANDT, P.W. (1975)

Human skeletal muscle : properties of the "chemically skinned" fiber.

Science, 187, 1075-1076.

Y

YAMAMOTO, N. & KASAI, M. (1982 a)

Characterization of the Ca^{2+} -gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.

J. Biochem., 92, 465-475.

YAMAMOTO, N. & KASAI, M. (1982 b)

Kinetics of the actions of caffeine and procaine on the Ca^{2+} -gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.

J. Biochem., 92, 477-484.

YAMAMOTO, N. & KASAI, M. (1982 c)

Mechanism and function of the Ca^{2+} gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles.

J. Biochem., 92, 485-496.

YAMAMOTO, N. & KASAI, M. (1982 d)

Inhibition of a voltage-dependent cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles by caesium studied by using a potential sensitive cyanine dye.

Biochim. Biophys. Acta, 692, 89-96.

