

50376  
1986  
53

50376  
1986  
53

# THESE

N° d'ordre 39

présentée à

**l'Université des Sciences et Techniques de Lille**

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE  
ANIMALES**

par

**ERIC HONORE**  
Allocataire du M.R.T

**MISE EN EVIDENCE ET ORIGINE DE DEUX  
COMPOSANTES DE LA CONTRACTION DU  
MUSCLE PAPILLAIRE DE COBAYE**



soutenue le 14 mai 1986 devant la Commission d'Examen

<b>Président</b>	<b>A. Robelet</b>	<b>Professeur à l'Université de Lille II</b>
<b>Examineurs</b>	<b>C.E Challice</b>	<b>Professeur à l'Université de Calgary (Canada)</b>
	<b>B. Dupuis</b>	<b>Professeur à l'université de Lille II</b>
	<b>Y.M. Gargouil</b>	<b>Professeur à l'Université de Poitiers</b>
<b>Rapporteurs</b>	<b>P. Guilbault</b>	<b>Professeur à l'Université de Lille I</b>
	<b>J. Nargeot</b>	<b>Professeur à l'Université de Tours</b>

*Travail réalisé en collaboration avec les laboratoires de  
Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Lille, de Biologie  
Cellulaire de l'Université de Lille I (U.A CNRS 308) et  
Department of Physics of the University of Calgary (Canada).*

A Monsieur le Professeur C.E. CHALLICE

Je vous suis très reconnaissant de m'avoir accueilli dans votre Laboratoire. J'ai bénéficié de la très haute qualité de vos conseils et de votre aide dans mes recherches.

Permettez-moi de vous exprimer mes sentiments de vive gratitude pour avoir accepté de juger ce travail et de respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur B. DUPUIS

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'accordez depuis que je partage la vie du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Lille.

Votre connaissance en Pharmacologie Clinique et Expérimentale et les entretiens que vous avez bien voulu m'accorder pour l'élaboration de ce travail et pour l'interprétation des résultats m'ont ouvert à ce souci de précision et de rigueur dans la Recherche Scientifique, dont vous me donnez constamment l'exemple.

A Monsieur le Professeur Y.M. GARGOUIL

Votre notoriété et votre audience internationale en matière d'Electrophysiologie Cellulaire Cardiaque et de Pharmacologie ajouteraient au redoutable honneur de vous compter parmi mes juges si je ne savais que chaque critique et commentaire que vous voudrez bien faire sur ce travail seront pour moi une source d'enrichissement. Je tiens aussi à vous remercier pour l'aide constante que vous avez bien voulu m'apporter durant la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Professeur P. GUILBAULT

Je vous dois d'avoir accédé au troisième Cycle de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, où l'excellent enseignement que vous dispensez, la très grande compétence et l'enthousiasme que vous manifestez pour l'Electrophysiologie Cellulaire m'ont permis de m'intéresser et de m'initier à cet aspect de la Physiologie.

Votre constante disponibilité, les aides et conseils multiples que vous me prodiguez depuis plusieurs années m'ont été d'un secours inappréciable.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et vous prie de croire à ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J. NARGEOT

La position éminente que vous occupez dans le domaine de la Physiologie Cardiaque Expérimentale, vos travaux importants et particulièrement intéressant sur des sujets très proches de celui de cette thèse rendent votre présence justifiée. Je sais que chaque remarque et chaque critique de votre part conduira à améliorer mes méthodes expérimentales et à comprendre plus précisément le mécanisme du couplage excitation-contraction des cellules cardiaques.

Je vous suis très reconnaissant de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être membre de ce jury.

A Monsieur le Professeur A. ROBELET

Je vous suis très reconnaissant de m'avoir accueilli  
dans votre Laboratoire.

J'ai pu apprécier vos grandes connaissances médicales  
et scientifiques auxquelles s'ajoutent des qualités humaines  
indispensables au maintien de la cohésion d'une équipe à laquelle  
j'espère encore appartenir de nombreuses années.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde  
gratitude ainsi que mon respectueux attachement.

Je tiens à remercier les docteurs, M. ADAMANTIDIS, J. CARON, C. LIBERSA, R. ROUET et A. VINCENT, membres du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Lille de m'avoir admis dans leur équipe et de n'avoir jamais épargné ni leur temps, ni leurs conseils pour me permettre de travailler le plus efficacement possible. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amitié.



A Martine

A mes Parents

A ma Famille

A mes Amis

PLAN

INTRODUCTION.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE : LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DES  
CELLULES CARDIAQUES.

1) Les influx de calcium.

A) Enregistrement des courants entrants calciques sur  
cellules isolées.

- Existence d'une importante série sur les préparations  
multicellulaires.

- Existence d'un courant sortant transitoire.

B) Existence de deux courants entrants de calcium  
correspondant à deux types de canaux calciques.

- Le courant entrant calcique rapide.

- Problèmes relatifs à la dissection du courant entrant  
calcique rapide.

- Le courant entrant calcique lent.

- Problèmes relatifs à la dissection du courant entrant calcique lent.

2) Rôle des influx calciques dans le couplage excitation-contraction.

A) Rôle des courants calciques entrants rapide et lent dans le couplage excitation-contraction.

B) Rôle de l'influx de Ca via l'échange Na-Ca dans le couplage excitation-contraction.

MATERIEL ET METHODE.

- Stimulation, enregistrement des activités électriques et mécaniques.

- Protocole expérimental.

RESULTATS.

- Obtention de la contraction biphasique.

- Maintien des deux composantes de contraction en milieu inhibant l'échange Na-Ca.

- Evolution des deux composantes de contraction en milieu inhibant partiellement l'échange Na-Ca.

- Evolution des deux composantes de contraction en milieu hypososique contenant différentes concentrations de TEA.

- Dépendance des deux composantes de contraction vis à vis du potentiel de membrane.

- Indépendance des deux composantes de contraction vis-à-vis de l'influx sodique rapide.

- Dépendance des deux composantes de contraction vis-à-vis du Ca extracellulaire.

- Effets des inhibiteurs calciques sur les deux composantes de contraction.

a) Le manganèse.

b) Le cadmium.

c) La nifédipine.

- Dépendance des deux composantes de contraction vis-à-vis des cations divalents.

a) Substitution du Ca extracellulaire par le Sr.

b) Substitution du Ca extracellulaire par le Ba.

- Effets de la fréquence de stimulation sur la contraction biphasique.

- Effets de la caféine et de la procaïne sur les deux composantes de contraction.

a) Effets de la caféine.

b) Dépendance de la seconde composante de contraction vis-à-vis du potentiel membranaire en présence de caféine.

c) Effets de la procaïne.

d) Effets de la procaïne en présence de caféine.

- Effets des ions TEA.

- Effets de l'isoprotérénol, du BAY K 8644 et de l'acétylcholine sur la contraction biphasique.

a) Effets de l'isoprotérénol.

b) Effets du BAY K 8644.

c) Effets de l'acétylcholine.

- Effets de l'hypoxie sur la contraction biphasique.

- Relation structure-fonction.

a) Muscle papillaire de rat.

b) Oreillette de cobaye.

c) Myocarde ventriculaire de grenouille.

DISCUSSION.

- Rôle de l'échange Na-Ca dans le développement de la contraction biphasique.

- Rôle des deux courants entrants de Ca dans le développement de la contraction biphasique.

- Origine de la première composante de contraction.

- Origine de la seconde composante de contraction.

- Interrelation des deux composantes de contraction.

- Relations entre l'ultrastructure et le décours de la contraction.

RESUME ET CONCLUSION GENERALE.

BIBLIOGRAPHIE.

## ABREVIATIONS UTILISEES

AMPc : 3-5 adénosine monophosphate cyclique

4-AP : 4-amino pyridine

ATP : adénosine triphosphate

Ba : barium

Ca : calcium

Cd : cadmium

Co : cobalt

Cs : césium

D.P.A 50 : durée du potentiel d'action mesurée à 50% de la repolarisation

e : exponentielle

E<sub>Ca</sub> : pile d'équilibre aux ions Ca

E<sub>ex</sub> : potentiel d'inversion de l'échange Na-Ca

E.G.T.A. : éthylène glycol tétra acétique

E<sub>m</sub> : potentiel de membrane

E<sub>Na</sub> : pile d'équilibre aux ions Na

g : gramme

GMP : guanosine mono phosphate

HP : holding potential

I : courant

I<sub>m</sub> : courant de membrane

I<sub>si</sub> : slow inward current

I<sub>ti</sub> : transient inward current

I<sub>to</sub> : transient outward current

log : logarithme



Mn : manganèse

Na : sodium

Ni : nickel

Niféd : nifédipine

P.A : potentiel d'action

R : résistance

R.S : réticulum sarcoplasmique

s : seconde

S : siemens

Sr : strontium

TTX : tétrodotoxine

V : potentiel

V<sub>m</sub> : potentiel de membrane

V/s : volt par seconde

## INTRODUCTION

Depuis les années 70, un nombre important de travaux traitent de l'origine de la contraction des cellules cardiaques. Cette contraction serait constituée de 2 composantes : l'une, phasique, corrélée directement ou indirectement au courant entrant lent de calcium ("slow inward current", ISi) ; l'autre dite tonique, corrélée au mécanisme d'échange Na-Ca.

A partir de 1981, Hume et Giles décrivent deux courants entrants de calcium dans les cellules cardiaques ; ces deux courants, l'un rapide, l'autre lent ne correspondent pas au mécanisme d'échange Na-Ca (Brown, 1984). De ce fait, 3 influx de Ca peuvent être déclenchés lors de l'activité des cellules cardiaques.

Cette étude a été menée dans le but de clarifier le problème liant les 3 influx de Ca à la contraction. Dans des conditions expérimentales permettant la suppression de l'échange Na-Ca et du courant entrant rapide de Na (milieu hyperpotassique sans sodium additionné d'isoprotérénol) deux composantes de contraction sont enregistrées. Elles sont corrélées aux deux courants entrants de calcium.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE : LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DES  
CELLULES CARDIAQUES.

1) Les influx de calcium.

Les cellules myocardiques ventriculaires présentent un potentiel d'action caractéristique en ce sens qu'elles restent dépolarisées pendant plusieurs centaines de ms (plateau du potentiel d'action). Durant cette phase de dépolarisation, un flux de Ca entre dans la cellule, flux correspondant au courant entrant de calcium qui a fait l'objet de nombreuses études depuis une quinzaine d'années. Les limitations techniques ne permettent cependant pas toujours une bonne définition des diverses composantes de ce courant. Au cours des 5 dernières années, grâce à la technique de potentiel imposé sur cellules isolées, les auteurs sont parvenus à disséquer le courant calcique de façon plus précise (Powell et Twist, 1976 ; Kao et al, 1980 ; Lee et Tsien, 1982, 1983, 1984 ; Isenberg et Klocner, 1982 ; Marban et Tsien, 1982 ; Mc Donald, 1982 ; Tsien, 1983 ; Hume et Giles, 1983 ; Mitchell et al, 1983 ; Bean, 1985).

A) Enregistrement des courants entrants calciques sur cellules isolées.

En 1967, Reuter met en évidence sur une préparation multicellulaire cardiaque, en conditions de potentiel imposé et en absence de Na, un courant entrant dont l'amplitude dépend de la concentration extracellulaire en Ca (fig 1). Lors d'une ample et durable dépolarisation (de -80 à +34 mV) ce courant s'active en 100 ms

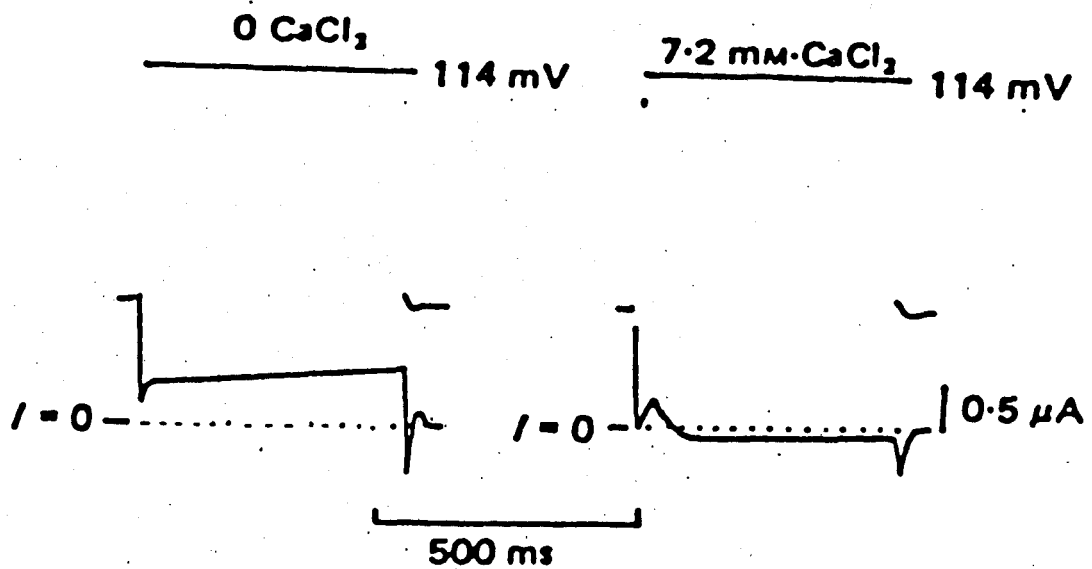


Fig 1 :

D'après Reuter (1967).

Mise en évidence d'un courant entrant de calcium sur des fibres de Purkinje. La préparation est dépolarisée de  $-80$  à  $+34$  mV.

partie gauche : solution sans Na et sans Ca.

partie droite : solution sans Na et contenant  $7.2$  mM de Ca.

Le temps au pic de courant est de  $100$  ms. Ce courant n'est pas complètement inactivé après  $500$  ms de dépolarisation.

et requiert plusieurs centaines de ms pour s'inactiver.

Depuis cette date, de nombreux auteurs décrivent à l'aide de techniques similaires ce courant entrant de Ca (slow inward current,  $I_{si}$ ) dont la constante de temps d'inactivation varie de 20 ms pour Rougier et al (1969) à plus de 500 ms pour Beeler (1970). Des travaux plus récents réalisés sur des cellules isolées, montrent qu'en fait le courant entrant de Ca s'active complètement en 2 à 5 ms et s'inactive en 10 à 20 ms (Isenberg et Klockner, 1982 ; Lee et Tsien, 1982 ; Hume et Giles, 1983 ; Mitchell et al, 1983 ; Lee et al, 1984 ; Brown et al, 1984 ; Josephson et al, 1984 ; Kokubun et Irisawa, 1984 ; Thomas et al, 1985 ; Bean, 1985) (fig 2). Deux éléments permettent de donner une explication à la discordance de ces résultats :

- Existence d'une importante résistance série dans les préparations multicellulaires.

L'existence d'une importante résistance série dans la plupart des préparations multicellulaires utilisées (1.6 K $\Omega$ .cm<sup>2</sup> pour Atwell et Cohen, 1977) comparée à celle trouvée dans des préparations de cellules isolées (30  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> pour Isenberg et Klockner, 1982) pourrait expliquer les différences de cinétique d'activation et d'inactivation du courant calcique. En effet, Isenberg et Klockner (1982), montrent lors d'une étude sur cellule isolée que l'introduction d'une résistance série ( $R_{sa}$ ) entre l'électrode de référence et le potentiel de terre entraîne une mauvaise imposition du potentiel transmembranaire  $V_m$  ( $V_m = V_i - V_o$ ).  $V_o$  qui est égal au produit de  $I_m$  par  $R_{sa}$ , provoque une déviation positive de  $V_m$  lorsque le courant est dans le sens entrant et une déviation négative de  $V_m$  lorsque le courant est dans le sens

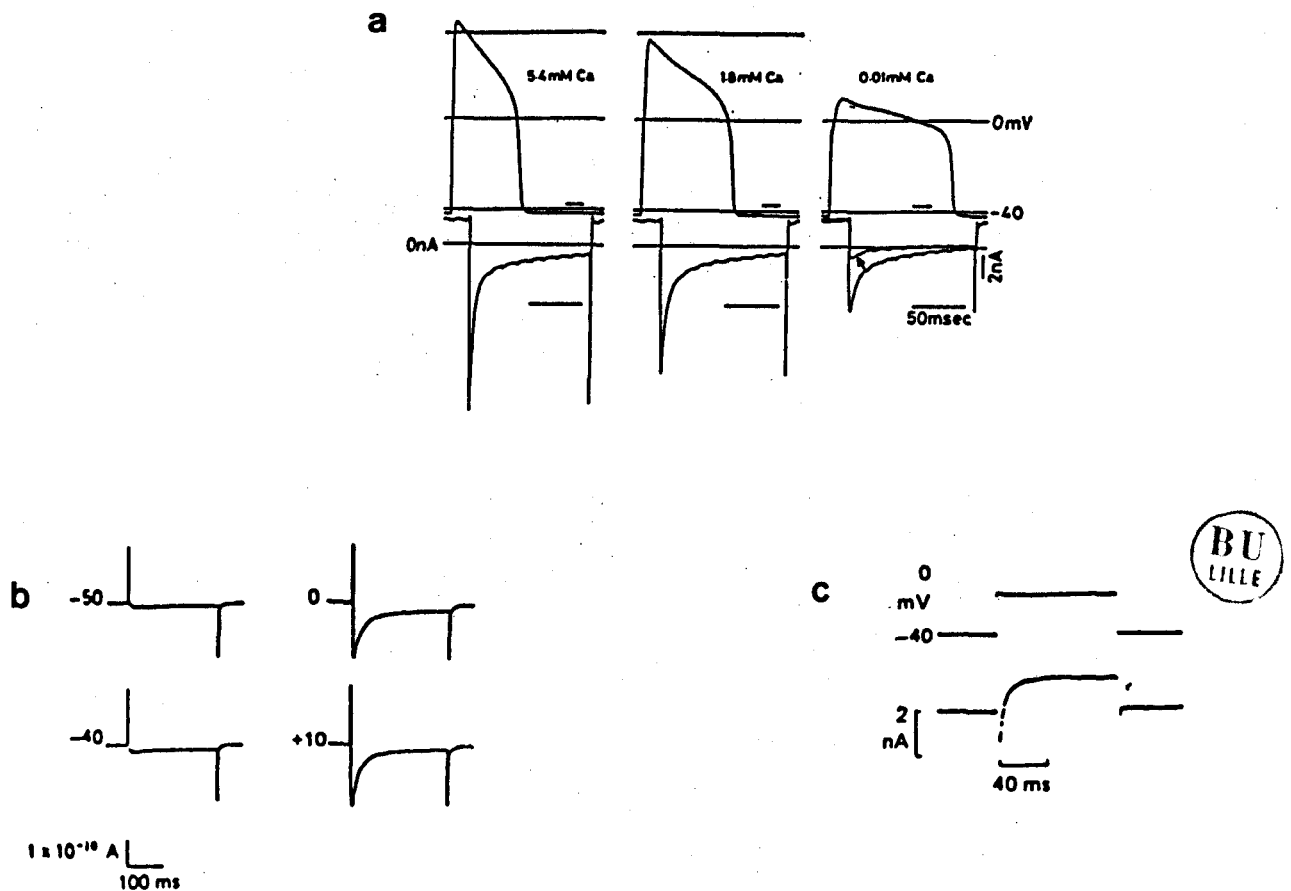


Fig 2 :

a) D'après Kokubun et Irisawa (1984).

Enregistrement du courant entrant rapide de calcium sur cellule ventriculaire isolée de cobaye. Le potentiel de départ est de  $-30$  mV et l'amplitude de l'impulsion de  $40$  mV. Les tracés de droite sont obtenus après 3 et 5 minutes de perfusion d'une solution de Tyrode contenant  $0.01$  mM de Ca.

b) D'après Hume et Giles (1983)

Enregistrement du courant calcique rapide sur cellule auriculaire isolée de grenouille.

Le potentiel de départ (HP) est de  $-80$  mV.

Le courant calcique rapide atteint son amplitude maximale en  $5$  ms et s'inactive en  $20$  ms au potentiel de  $+10$  mV. Un courant "maintenu" est aussi présent à ce potentiel.

c) D'après Mitchell et al (1983).

Enregistrement du courant calcique rapide sur cellule ventriculaire isolée de rat. Le potentiel de départ est de  $-40$  mV. Le courant atteint son amplitude maximale en  $3$  ms et s'inactive avec une constante de temps de  $10$  ms au potentiel de  $0$  mV.

sortant (fig 3). Dans ces conditions, le potentiel est mal imposé puisqu'il varie dans le temps. Etant donné que  $V_m$  n'est pas constant, le courant capacitif est associé au courant de membrane durant une grande partie de l'impulsion dépolarisante et de ce fait "parasite" le courant entrant rapide calcique. De plus, "l'échappement" du potentiel de membrane dû à  $V_o$  modifie la cinétique et l'amplitude du courant calcique dépendantes du potentiel. Ces observations montrent donc sans ambiguïté que l'existence d'une importante résistance en série avec la préparation entraîne une distorsion importante du courant calcique.

- Existence d'un courant sortant transitoire.

La résistance série ne permet cependant pas d'expliquer entièrement les différences de résultats rapportés dans la littérature. En effet, même avec une résistance série importante (Isenberg et Klockner, 1982), le temps au pic de courant de Ca n'est que de 13 ms alors que pour les préparations multicellulaires ce temps au pic de courant calcique est de l'ordre de 100 ms (Reuter, 1969). Siegelbaum et Tsien (1980) puis Marban et Tsien (1982) montrent que l'injection intracellulaire d'EGTA ou de Cs dans des préparations multicellulaires permet de démasquer un courant calcique rapide de forte amplitude malgré l'importante résistance série (fig 4). L'EGTA et le Cs permettent de supprimer le courant sortant transitoire (Ito) (Bassingthwaighte, 1975 ; Isenberg, 1977).

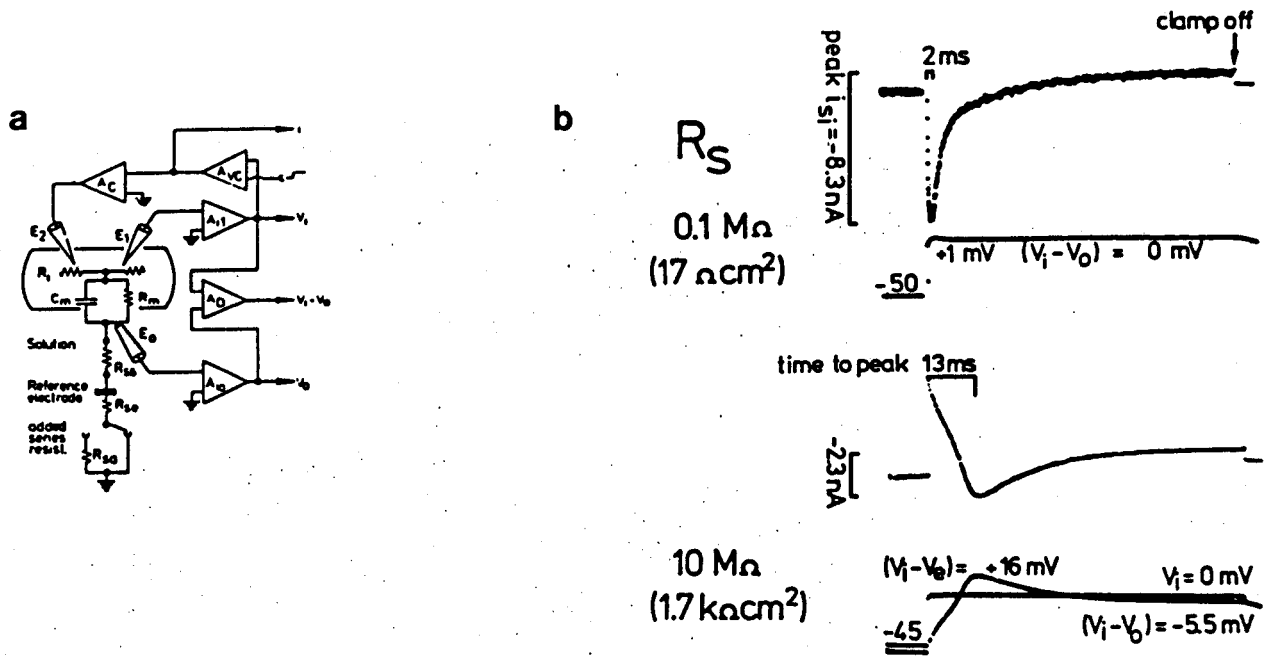


Fig 3 :

a) D'après Isenberg et Klockner (1982).  
 Schéma du montage utilisé pour mettre en évidence l'influence de la résistance série sur le contrôle du potentiel et les caractéristiques du courant entrant de Ca.

b) D'après Isenberg et Klockner (1982).  
 Effet de l'addition d'une résistance série sur le contrôle du potentiel et sur les caractéristiques du courant calcique entrant.  
 Le potentiel de départ est de  $-50 \text{ mV}$  et l'amplitude de l'impulsion de  $50 \text{ mV}$ .  
 $V_i$  est imposé correctement mais  $V_i - V_0$  varie dans le temps.





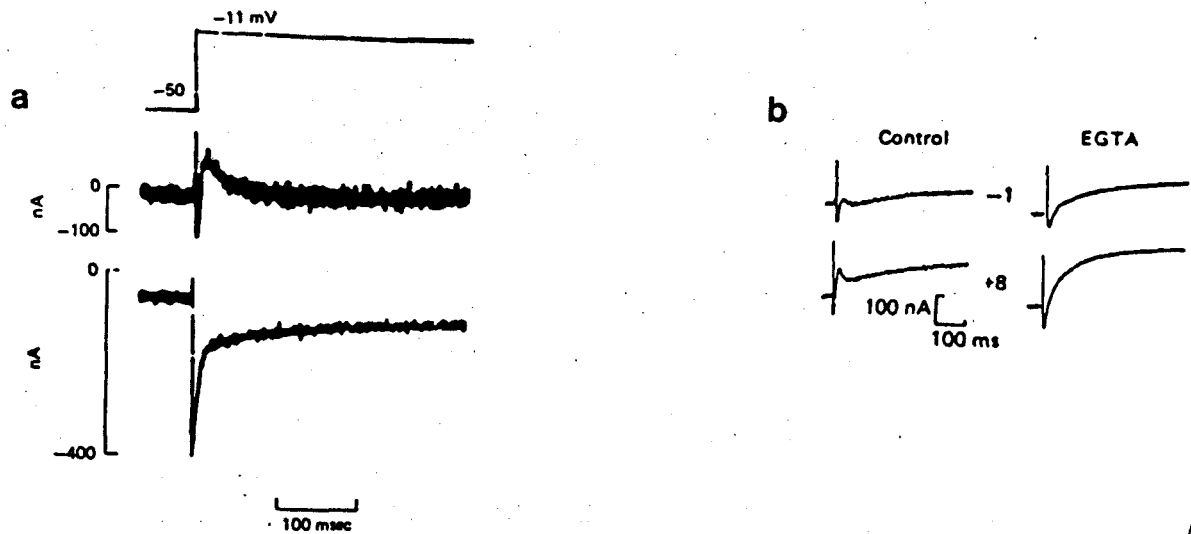


Fig 4 :

a) D'après Marban et Tsien (1981).

Effet du Cs introduit dans le milieu intracellulaire sur le courant de calcium des fibres de Purkinje. Après addition de Cs au milieu intracellulaire, le courant de Ca est de forte amplitude et de cinétique rapide.

b) D'après Siegelbaum et Tsien (1980).

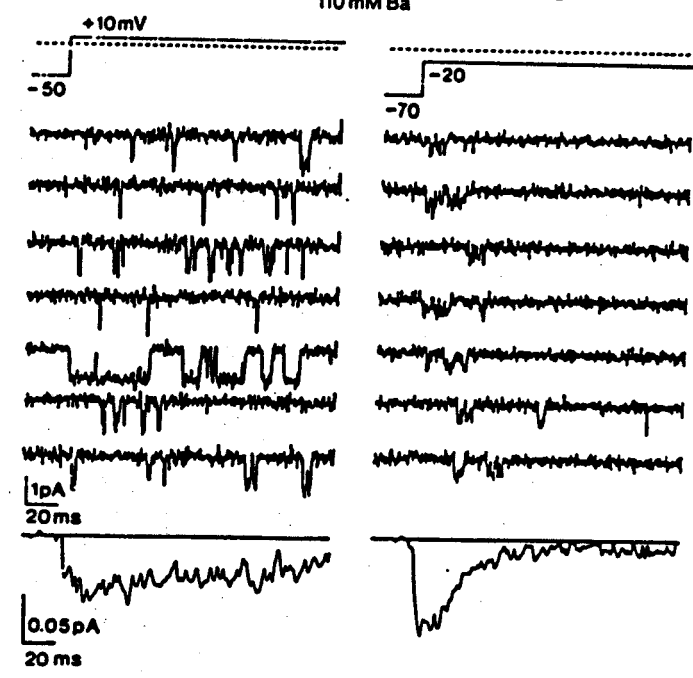
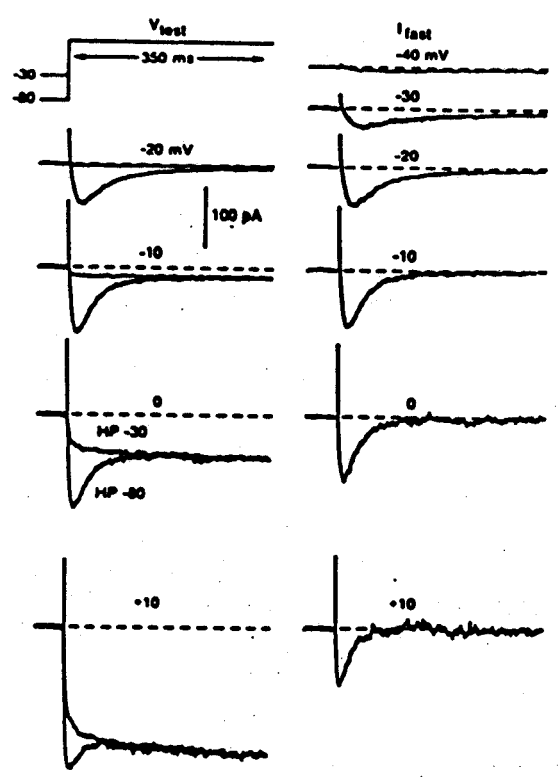
Le potentiel de départ est de  $-46$  mV et l'amplitude de l'impulsion de  $47$  mV ou de  $54$  mV. Après injection d'EGTA, le courant obtenu sur cette préparation multicellulaire (fibres de Purkinje) ressemble à celui observé sur cellule isolée.

B) Existence de deux courants entrants de calcium correspondant à deux types de canaux calciques.

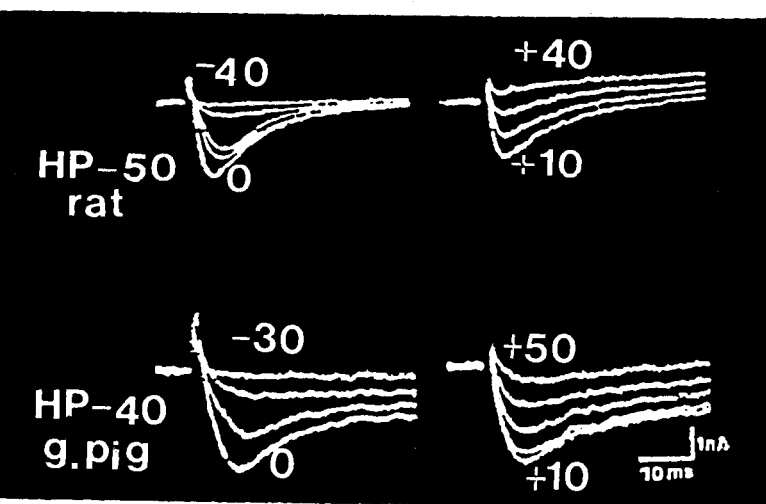
Dès 1976, un courant calcique maintenu résiduel correspondant probablement au courant entrant lent est décrit par Kass et al et Reuter et Scholz sur des préparations multicellulaires (fig 5d). Sur des cellules isolées, Lee et Tsien (1982, 1983), Mc Donald (1982), Marban et Tsien (1982), Tsien (1983), Hume et Giles (1983), Noble (1984), Lee et al (1983, 1984), Josephson (1984), Bean (1985) décrivent deux courants entrants de Ca (fig 5). Le premier est de cinétique rapide et s'active pour des potentiels relativement négatifs alors que le second de cinétique plus lente, s'active pour des potentiels moins négatifs. Cela vient d'être confirmé par Nilius et al (1985) qui décrivent dans des conditions de "patch clamp", deux types de canaux calciques correspondant aux deux courants calciques précédemment décrits (fig 5).

Deux types de canaux calciques sont aussi décrits sur d'autres préparations (non cardiaques) par Hagiwara et al (1975) sur les oeufs d'étoile de mer, Deitmer (1984) sur le cilié *Stylonichia*, Fox et Krasne (1984) sur les oeufs de Polychaete, Jdaiaa et Guilbault (1986) sur la fibre musculaire d'écrevisse, sur les neurones par Ilinas et Yarom (1981), Nowycky et al (1984), Carbone et Lux (1984), Tsanoo et al (1984, 1985), Yoshi et al (1984), Mattesson et Armstrong (1984), Fedulova et al (1985), Armstrong et Mattesson (1985), Cohen et Mc Carthy (1985), Chesnois Marchais (1985).

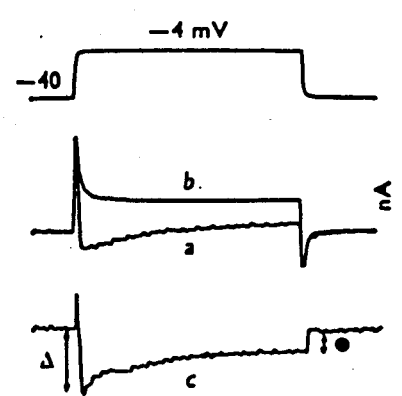
a



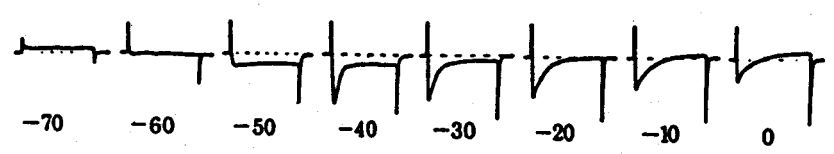
c



d



e



- Le courant entrant calcique rapide.

Bean (1985) montre que le courant calcique rapide des cellules isolées d'oreillette de chien étudiées selon la technique de "whole cell attach" (dialyse du milieu intracellulaire en présence d'EGTA, de Cs et en l'absence de Na externe) n'est présent que si le potentiel de départ (Holding Potential, HP), est très négatif (fig 5a). Ce courant s'inactive rapidement (10 ms au potentiel de 10 mV). De plus il est insensible à la TTX mais bloqué par les ions Co. L'étude concernant les fluctuations de ce courant montre que la conductance unitaire est de 8 pS et que cette dernière est identique lorsque le Ca ou le Ba est utilisé comme transporteur de charges. Ce canal calcique rapide est également insensible aux dihydropyridines et à l'isoprotérénol. Nilius et al (1985) dans des conditions de "patch clamp" montrent que la conductance unitaire du canal calcique rapide est bien de 8 pS et qu'elle demeure inchangée lorsque le Ca est remplacé par le Ba (fig 5b). Ces auteurs montrent en outre que le courant correspondant s'active pour des potentiels relativement négatifs et reste présent dans la configuration "inside out patch". Le courant global est là encore insensible aux dihydropyridines et au Cd.

Il faut cependant noter que l'utilisation des techniques de "whole cell attach" et de "patch clamp" respectivement par Nilius et al (1985) et Bean (1985) leur permet en particulier de contrôler très précisément la composition des milieux intra et extracellulaire. Ces

auteurs ajoutent en outre au milieu interne de l'EGTA et au milieu externe sans Na du Ca ou du Ba. En effet l'utilisation de l'EGTA dans le milieu interne et du milieu externe sans Na permet de bloquer l'échange Na-Ca et ainsi d'éviter le développement d'un courant d'échange (courant transitoire entrant, (Iti). De même l'EGTA permet de bloquer le courant transitoire sortant (Ito) qui est activé par le Ca intracellulaire (Siegelbaum et Tsien, 1980), et qui perturbe le décours du courant calcique rapide (fig 4).

Josephson et al (1984) montrent sur des cellules isolées de ventricule de rat et de cobaye étudiées dans des conditions de potentiel imposé à l'aide d'une microélectrode unique, que la 4AP et le TEA n'ont pas d'effet sur le courant entrant calcique rapide. L'inactivation de ce courant n'est donc pas due à un courant sortant transitoire puisque la 4 AP en particulier est bien connue pour bloquer ce courant (Siegelbaum et Tsien, 1980). Ces auteurs montrent de plus que l'addition d'EGTA au milieu intracellulaire ralentit la cinétique d'inactivation du courant rapide. De ce fait, ils concluent à un mécanisme d'inactivation dépendant de l'entrée de Ca.

Lee et Tsien (1982), Hume et Giles (1983), Lee et al (1984), Noble (1984) montrent que le Cd bloque spécifiquement le courant calcique rapide. Mitchell et al (1983) montrent dans les mêmes conditions d'enregistrement du courant membranaire que le Ni, le Mn, la nifédipine, la nimodipine et le D600 inhibent le courant calcique rapide et que le Sr et le Ba ralentissent la cinétique d'inactivation de ce courant. Une réduction de la concentration extracellulaire en Na entraîne aussi selon ces auteurs, une nette diminution de son

amplitude. Lee et al (1985) montrent que, sur des cellules isolées de cobaye étudiées selon la technique de "whole cell attach" en présence de Cs intracellulaire et en absence de Na extracellulaire, l'inactivation du courant calcique rapide est aussi ralentie lorsque le Ca est remplacé par le Ba. Par contre pour des dépolarisations importantes, la constante de temps d'inactivation de ce courant rapide est diminuée en présence de Ca et augmentée en présence de Ba. Ceci traduit selon ces auteurs une inactivation dépendante du potentiel et de l'entrée de Ca.

Isenberg et Klockner (1982) montrent également sur des cellules myocardiques isolées étudiées à l'aide de 2 microélectrodes que le courant entrant calcique rapide est bloqué par le D600, le Ni et le Co ; par contre l'isoprotérénol augmenterait l'amplitude de ce courant. Le potentiel d'inversion de ce courant est de + 60 mV, valeur identique à celle déterminée par Lee et Tsien (1982, 1983). De même Kokubun et Irisawa (1984) montrent grâce à la technique de "whole cell attach" que l'augmentation de la concentration externe de Ca augmente l'amplitude et la cinétique d'inactivation du courant rapide. En réduisant la  $PCa_i$  de 9 à 6.8, ces auteurs observent également une diminution de l'amplitude du courant ; par contre, la cinétique d'inactivation reste inchangée. De ce fait ils proposent que la réduction d'amplitude du courant calcique rapide est due à une diminution de la conductance par le biais du Ca entrant dans la cellule (indépendamment de la diminution du gradient électrochimique des ions Ca).

En résumé, des différences notables apparaissent entre les résultats décrits ci-dessus, certains auteurs décrivant en effet le canal calcique rapide comme étant sensible aux dihydropyridines, au Cd, à l'isoprotérénol alors que d'autres montrent qu'il est insensible à ces mêmes substances. De plus Bean (1985), Nilius et al (1985) montrent que la cinétique d'inactivation du canal calcique rapide n'est pas affectée lorsque le Ca est remplacé par le Ba alors que Lee et al (1982, 1983), Kokubun et Irisawa (1984), Josephson et al (1984) obtiennent des résultats inverses. En fait, l'analyse approfondie des données de la littérature révèle que la dépolarisation membranaire induit 3 composantes de courant entrant : deux courants (courant calcique rapide et courant calcique lent) s'écoulent au travers de canaux ; quant au troisième, il correspond au courant dû au mécanisme d'échange Na-Ca. En prenant en compte l'existence de ces 3 courants, les résultats des différents auteurs en apparence divergents peuvent être conciliés.

- Problèmes relatifs à la dissection du courant entrant calcique rapide.

Di Francesco et al (1982), Lee et al (1983, 1984), Brown et al (1983) montrent qu'il existe une troisième composante de courant entrant différente de celles correspondant aux courants calciques rapides et lents (fig 6a). Il s'agit du courant d'échange Na-Ca. Ce courant apparaît être similaire à celui décrit par Lederer et Tsien (1976) et Eisner et Lederer (1979) (fig 6b et 6c). Ces derniers auteurs montrent qu'en l'absence d'activité de la pompe Na-K (absence de K externe ou utilisation de digitaliques), un courant entrant dont

l'activation et l'inactivation sont de même durée, apparaît lors de la repolarisation. Ce courant est contemporain des post-contractions ; il est appelé courant transitoire entrant (Iti). Il peut-être inhibé par la caféine ou la tétracaïne (Eisner, 1979) (fig 6c). Brown (1984) observe que ce courant d'échange Na-Ca, stimulé par les augmentations de l'activité du Ca intracellulaire apparaît dans les conditions normales (fig 6a). Il montre que pour des "HP" négatifs, une seule composante de courant précoce apparaît. Il s'agit en fait de la somme algébrique du courant calcique rapide et du courant entrant d'échange Na-Ca. Pour des HP moins négatifs, seul le courant d'échange Na-Ca serait présent, l'autre courant étant inactivé ; dans ces conditions, la disponibilité de la conductance calcique rapide serait quasiment nulle (Bean, 1985).

Selon Reuter (1968), Glitsh et al (1980), Mullins (1981), Horackova (1984), cet échange Na-Ca est électrogène. Il peut être schématisé de la façon suivante : un transporteur mobile peut s'associer de façon compétitive avec 1 ion Ca ou n ions Na (n étant supérieur ou égal à 3) de chaque côté de la membrane (fig 7). La réaction est rapide, le mouvement du transporteur dans la membrane est de vitesse limitée et dépend des gradients électrochimiques de ces cations. L'échange est bidirectionnel et les mouvements des cations dépendent du potentiel de membrane. Un tel système peut donc produire un courant entrant ou sortant dont l'amplitude dépendrait selon les auteurs de la différence ( $E_m - E_{ex}$ ). La valeur du potentiel d'inversion du courant d'échange Na-Ca ( $E_{ex}$ ) est donnée par l'équation  $2E_{Na} - E_{Ca}$  pour  $n = 4$ . D'après Mullins (1981) et Horackova et Vassort (1979), la valeur de ce potentiel d'inversion est de -40 mV. Cependant Arlock et



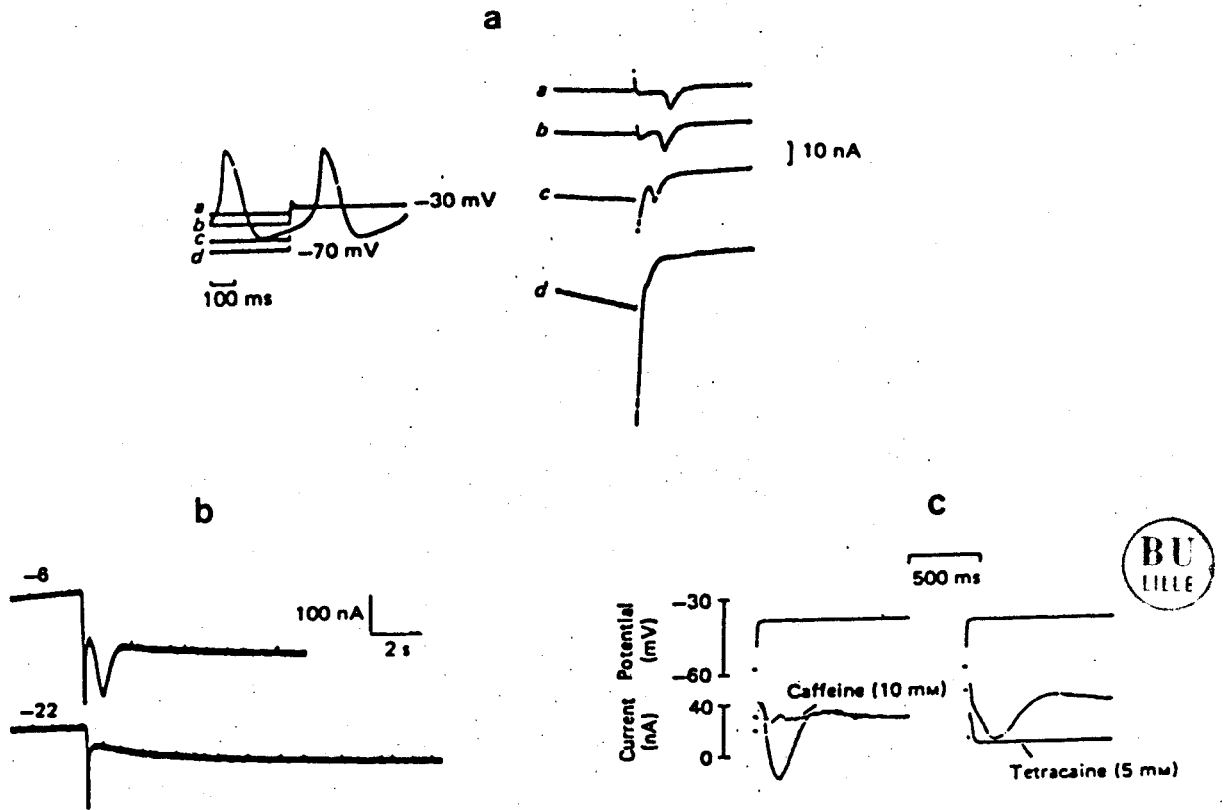


Fig 6 :

a) D'après Brown (1984).

Enregistrement du courant d'échange Na-Ca sur cellule isolée du noeud sino-auriculaire de lapin. En d, le courant d'échange est fusionné avec le courant calcique rapide ; en a, le courant calcique rapide est inactivé et seul le courant d'échange subsiste.

b) D'après Lederer et Tsien (1976).

Enregistrement du courant d'échange Na-Ca lors de la repolarisation de la membrane au potentiel de  $-72$  mV sur des fibres de Purkinje après une dépolarisation de 5 sec aux potentiels de  $-6$  ou de  $-22$  mV et après traitement à la strophanthidine.

c) D'après Eisner (1979)

Enregistrement du courant d'échange Na-Ca sur des fibres de Purkinje dépolarisées de  $-58$  à  $-40$  mV. Ce courant est inhibé par la caféine et la tétracaine.

Katzung (1982), Karagueuzian et Katzung (1983) ne trouvent pas de potentiel d'inversion pour les cellules ventriculaires. Herning et Verecke (1983) montrent clairement que le courant induit par l'échange Na-Ca est nul pour les potentiels compris entre  $-40$  mV et  $0$  mV et devient ensuite légèrement de sens sortant pour des potentiels plus positifs. Noble (1984) propose que ce courant d'échange ne possède pas de potentiel d'inversion tel que celui décrit selon le modèle d'Hogkin-Huxley puisque ce courant d'échange est contrôlé d'une part par la concentration de Ca intracellulaire et d'autre part par le potentiel. Mullins (1981) suppose  $n$  égal à 4 et montre que le courant induit par l'échange Na-Ca est de sens entrant puis de sens sortant durant le potentiel d'action (fig 7a). Ainsi ce courant, s'ajoutant algébriquement au courant entrant calcique rapide peut aussi expliquer la faible valeur estimée de son potentiel d'inversion ( $+ 60$  mV) (fig 7b).

L'existence de ce courant composite peut expliquer les résultats en apparence surprenants obtenus par certains auteurs. Ainsi Mitchell (1983) indique qu'une diminution de la concentration sodique extracellulaire réduit l'amplitude du courant entrant calcique rapide. La diminution de la concentration sodique extracellulaire induirait une augmentation de l'influx de Ca via l'échange Na-Ca entraînant une réduction du courant d'échange dans le sens entrant. De ce fait la diminution apparente de l'amplitude du courant calcique rapide ne correspondrait en fait qu'à la diminution du courant d'échange Na-Ca.

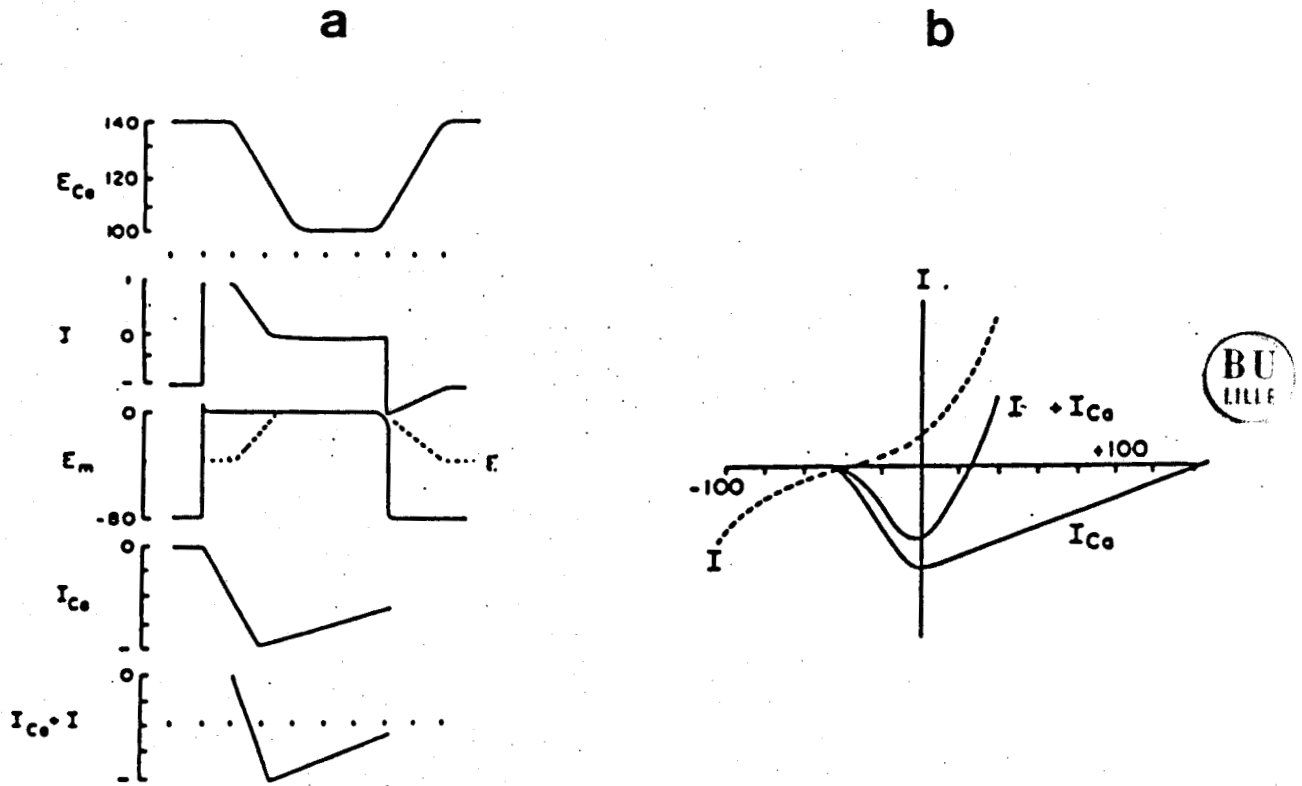


Fig 7 :

a) D'après Mullins (1981).  
Evolution théorique de  $I_{Ca}$ ,  $I$ ,  $E_m$ ,  $E$  et  $I_{Ca} + I$  durant un potentiel d'action en supposant  $n$  égal à 4.

b) D'après Mullins (1981).  
Courbe courant-potentiel théorique du courant calcique pur, du courant d'échange et de la somme des courants calcique et d'échange.

Les différents résultats décrits par les auteurs concernant la sensibilité du courant calcique rapide vis-à-vis du Cd, de l'isoprotérénol et des dihydropyridines peuvent aussi s'expliquer. En effet Bean (1985) et Nilius et al (1985) qui travaillent dans des conditions permettant de bloquer d'une part l'échange Na-Ca (EGTA dans le milieu interne et absence de Na dans le milieu extracellulaire) et d'autre part les courants sortants (le Ba étant utilisé comme transporteur de charges) enregistrent un courant calcique rapide "pur". Ils montrent que dans ces conditions ce courant est insensible à l'isoprotérénol, au Cd et aux dihydropyridines mais qu'il est bloqué spécifiquement par le cobalt.

En résumé, dans les conditions de potentiel imposé si des précautions ne sont pas prises, le courant entrant rapide de Ca est souvent un courant composite (courant calcique rapide et courant d'échange Na-Ca). De la même façon, il est possible d'envisager que toute drogue modifiant le courant entrant lent (agoniste ou antagoniste) entraînera une modification de l'activité intracellulaire du Ca et indirectement du courant d'échange Na-Ca qui est fusionné avec le courant calcique rapide.

Il est important de noter en outre que le courant rapide conserve les mêmes cinétiques d'activation et d'inactivation, qu'il soit transporté par les ions Ca ou par les ions Ba (Nilius et al, 1985 ; Bean, 1985). L'inactivation de ce canal serait donc dépendante du potentiel. Le canal par lequel passe le courant rapide présente une faible conductance de 8 pS (Bean, 1985 ; Nilius et al, 1985), valeur

identique à celle qui peut être calculée à partir des enregistrements de courant unitaire obtenus récemment par Chesnois Marchais (1985) en configuration de "outside out patch clamp" sur des neurones d'Aplysie.

- Le courant entrant calcique lent.

Déjà en 1976, Kass et al et Reuter et Scholz décrivent, sur des fibres de Purkinje, un courant entrant résiduel correspondant selon eux à une inactivation incomplète des canaux calciques (fig 5d). Il s'agirait en fait de l'enregistrement du courant calcique lent, ce courant étant augmenté par l'adrénaline et inhibé par le D600. Lee et al (1984), grâce à une dissection pharmacologique, démasquent un courant entrant calcique lent différent du courant entrant calcique rapide (fig 5c). Ce courant lent n'est pas bloqué par le Cd et la TTX. A -60 mV, il présente une amplitude maximale après 200 ms et ne s'inactive pas. Ce courant calcique entrant est à l'origine de potentiels d'action lents dont l'inversion de potentiel s'effectue à 0 mV et dont le plateau est situé entre -10 et -30 mV. Selon Lee et al (1983, 1984), ce courant serait responsable du plateau du potentiel d'action recueilli en conditions standard. Hume et Giles (1983) observent sur les fibres auriculaires de grenouille un courant maintenu de Ca ne s'inactivant pas en fonction du temps et résistant au Cd. Josephson et al (1984) (fig 2b) démontrent également au niveau des cellules myocardiques ventriculaires de cobaye l'existence d'un tel courant lent qui serait par contre inexistant sur les cellules ventriculaires de rat. Récemment, Bean (1985) décrit un courant calcique entrant lent sur les cellules auriculaires de chien. Ce courant peut être déclenché à partir d'une valeur de potentiel de

membrane faiblement négative et s'active lentement en fonction du temps (fig 5a). Bean (1985) montre en outre que le courant est plus ample lorsque le Ca est remplacé par le Ba comme transporteur de charges et qu'il est sensible aux dihydropyridines et à l'isoprotérénol.

Reuter (1983) observe en "patch clamp" que la conductance unitaire du canal lent est de 25 pS, que cette conductance ne varie pas en fonction du potentiel et que la probabilité d'ouverture des canaux augmente avec la dépolarisation. Cet auteur trouve un temps moyen d'ouverture de 1 ms à 25°C et montre que l'isoprénaline n'affecte pas la conductance unitaire du canal mais plutôt la probabilité d'ouverture. Récemment, Cavalié et al (1983) observent sur des myocytes de cobaye que pour de fortes dépolarisations, les ouvertures des canaux se groupent préférentiellement au début de l'impulsion ; de plus dans la mesure où la conductance est de 18 pS, le canal correspondrait probablement au canal lent calcique puisque la conductance du canal rapide, n'est que de 8 pS. La formation d'un "inside out patch" entraîne la disparition rapide du courant. Ces auteurs observent que les temps moyens d'ouverture de ce canal correspondent à une distribution du premier ordre alors que ceux de fermeture correspondent à une distribution du second ordre. A la lumière de ces résultats, ils proposent donc un schéma fonctionnel à 3 étapes : un état ouvert et deux états fermés dont les constantes de transition dépendraient du potentiel.

A l'appui de ce schéma fonctionnel du canal lent calcique à 3 états, Hess et al (1985) montrent que les dihydropyridines agonistes augmentent la probabilité selon laquelle le canal serait dans un état de longue ouverture et de brève fermeture. Par contre, les dihydropyridines antagonistes augmenteraient la probabilité selon laquelle ce canal se trouverait dans un état fermé (fig 9). Reuter (1983), considérant les effets de l'isoprotérénol, propose lui aussi l'hypothèse selon laquelle la probabilité d'ouverture des canaux serait augmentée par modification des constantes  $K_1$ ,  $K_2$  et  $K-2$  (fig 9).

Récemment Nilius et al (1985) proposent pour la conductance unitaire du canal lent une valeur de 25 pS et observent que le courant entrant lent est plus ample lorsque le Ba est utilisé à la place du Ca comme transporteur de charges (fig 5b). Ce courant s'active pour des potentiels relativement peu négatifs. Il disparaît en "inside out patch". Il est bloqué par les dihydropyridines antagonistes et le Cd, augmenté par le BAY K 8644.

- Problèmes relatifs à la dissection du courant entrant calcique lent.

Le canal calcique lent apparaît être sensible aux diverses substances généralement utilisées pour appréhender les mécanismes de fonctionnement des canaux calciques. Cependant pour Lee et al (1984) et Noble (1985), le courant entrant lent est insensible au Cd alors que Nilius et al (1985) et Bean (1985) rapportent son inhibition par ce même ion. De plus, Lee et al (1984) montrent que la réduction du K intracellulaire (augmentation de la concentration intracellulaire en Na par blocage de la pompe Na-K), diminue l'amplitude du courant entrant

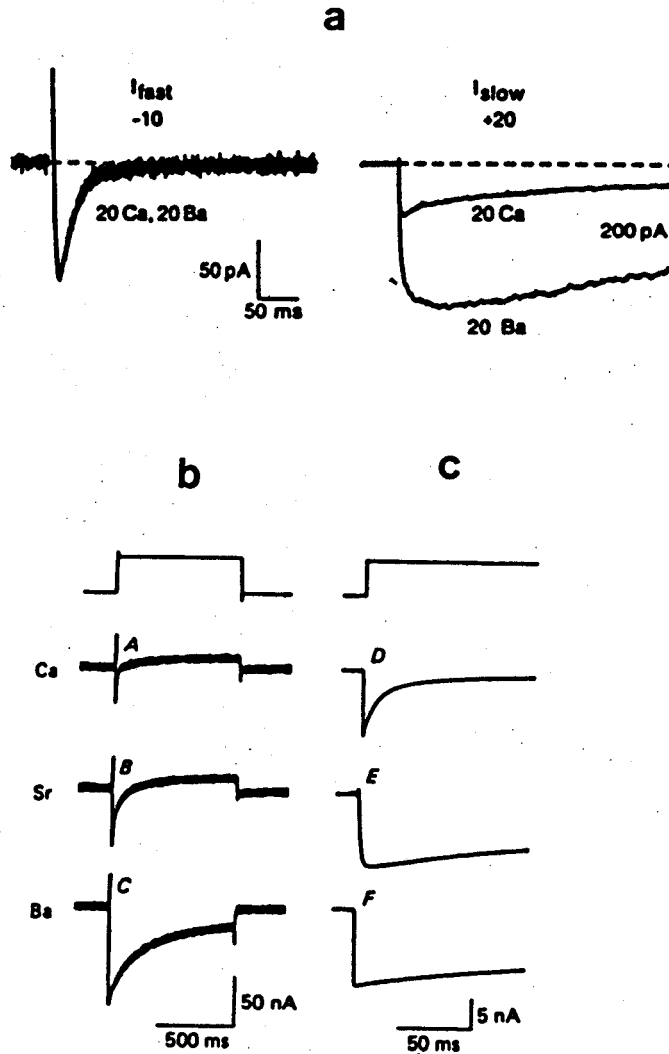


Fig 8 :

a) D'après Bean (1985)

Enregistrement des courants entrants rapide et lent en présence de Ca et de Ba. Pour le courant rapide, le potentiel de départ est de  $-80$  mV et pour le courant lent, il est de  $-30$  mV.

b) D'après Lee et al (1984).

Enregistrement du "courant entrant" en présence de Cs intracellulaire sur des fibres de Purkinje. Le potentiel de départ est de  $-36$  mV et l'amplitude de la dépolarisation de  $38$  mV.

A :  $5.4$  mM de Ca

B :  $5.4$  mM de Sr

C :  $5.4$  mM de Ba

c) D'après Lee et al (1984)

Enregistrement du "courant entrant" en présence de Cs intracellulaire sur cellule ventriculaire isolée de cobaye. Le potentiel de départ est de  $-40$  mV et l'amplitude de la dépolarisation de  $60$  mV.

A :  $5.4$  mM de Ca

B :  $5.4$  mM de Sr

C :  $5.4$  mM de Ba



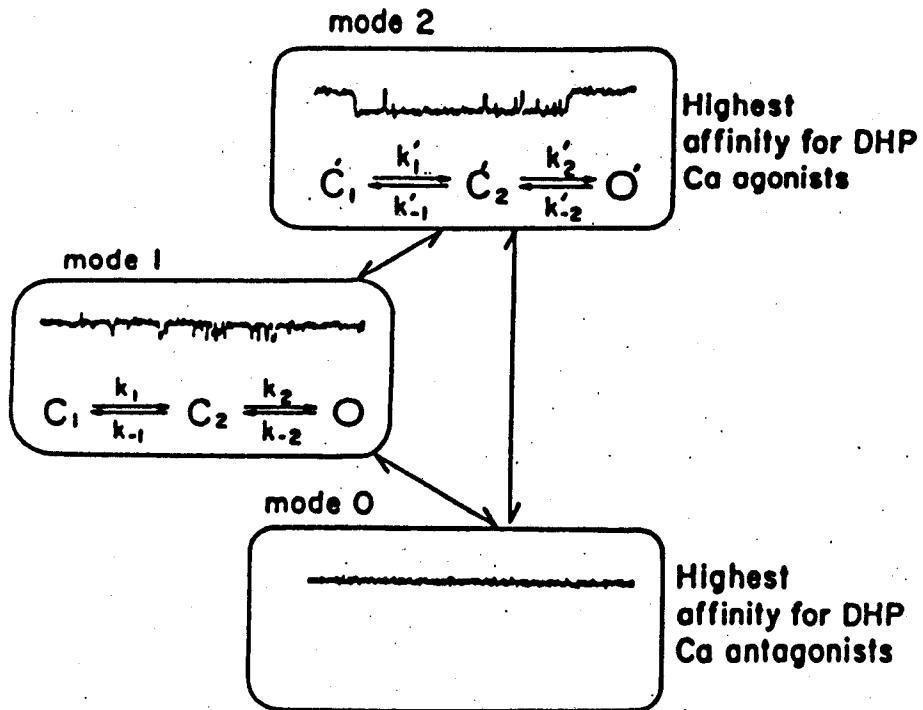


Fig 9 :

D'après Hess et al (1985)  
Schéma fonctionnel du "canal calcique". Effets des dihydropyridines agonistes et antagonistes.

lent. Les résultats apparaissent également différents selon les auteurs concernant l'inactivation des canaux calciques : pour certains cette inactivation dépend du potentiel (Bean, 1985) (fig 8a) et pour d'autres du potentiel et de l'entrée de Ca (Lee et al, 1985) (fig 8b).

A la lumière de ces récents résultats, il semble que les interprétations relatives au courant calcique lent doivent être reconsidérées. En effet, Bean (1985) montre bien que le courant entrant rapide est identique qu'il soit porté par les ions Ba ou les ions Ca (fig 8). Par contre, le courant entrant lent est plus ample quand il est porté par le Ba. De ce fait, en présence de Ba, le ralentissement apparent de la cinétique d'inactivation du courant entrant calcique rapide peut ne correspondre qu'à une augmentation de l'amplitude du courant entrant lent venant se superposer au courant calcique rapide. Le protocole consistant à utiliser l'EGTA dans le milieu interne pour mettre en évidence une inactivation dépendante du Ca doit être lui aussi reconsidéré. En effet l'EGTA est bien connu pour bloquer les courants transitoires entrants et sortants par le biais d'une diminution de l'activité du Ca intracellulaire.

Les répercussions apparentes de modifications des activités du Na et du Ca intracellulaires sur l'amplitude du courant calcique lent peuvent aussi s'expliquer par l'existence du mécanisme d'échange Na-Ca conduisant à un mouvement de charges (en d'autres termes d'un courant) qui s'ajouterait algébriquement au courant entrant lent de Ca. De ce fait on comprendrait mieux les résultats des différents auteurs apparemment sinon contradictoires, du moins différents selon

l'importance prise dans les conditions expérimentales diverses par le courant calcique lent et par le courant d'échange Na-Ca dans le déroulement global du courant "calcique".

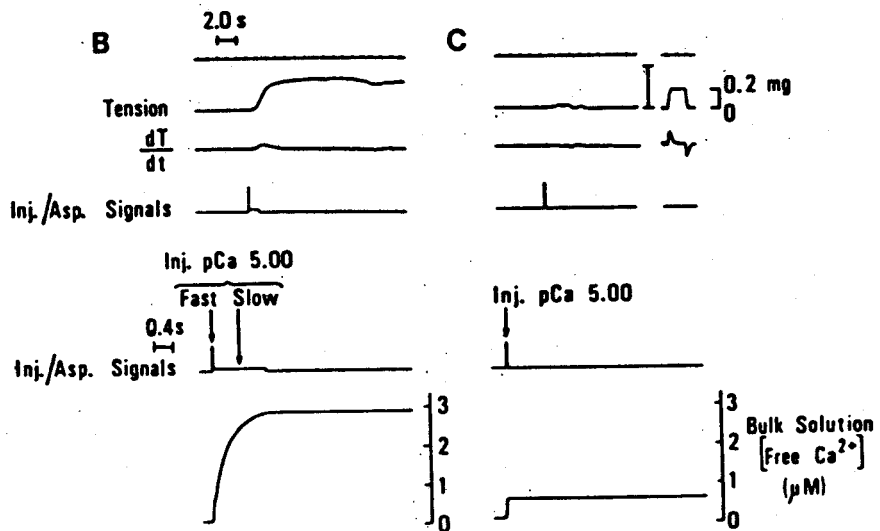
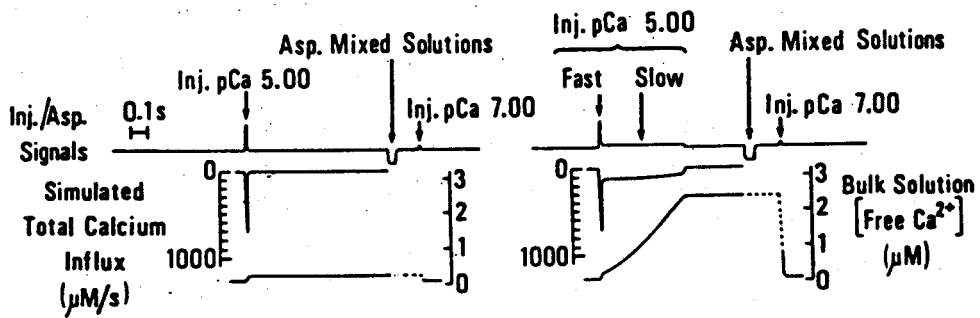
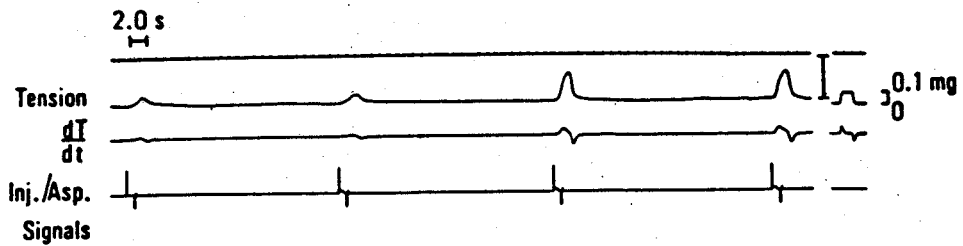
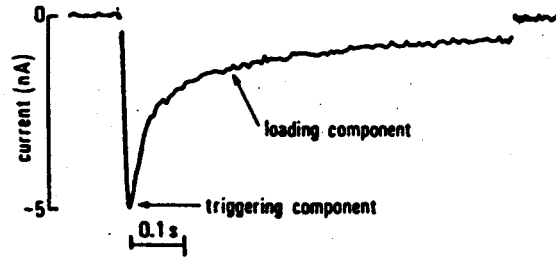
En résumé l'analyse des données de la littérature montre que beaucoup de résultats d'expériences devraient être reconsidérés avec prudence puisque la "dissection" des courants n'est pas toujours parfaite. Quoiqu'il en soit, il apparaît maintenant évident que dans les conditions physiologiques normales, 3 influx de Ca peuvent apparaître lors d'une dépolarisation membranaire des cellules cardiaques : 1) l'un, précoce, correspond au courant entrant calcique rapide passant par le canal rapide insensible à diverses drogues ; 2) un second, plus lent, passant par le canal lent qui est, contrairement au précédent, sensible à diverses drogues ; 3) enfin, le dernier correspondant au mécanisme d'échange Na-Ca. Ainsi, l'importance d'un influx calcique par rapport aux autres peut conditionner le déroulement des activités électrique et mécanique. En effet, certaines espèces animales comme le cobaye présentent une composante de courant lent plus marquée que d'autres tel le rat expliquant ainsi le déroulement différent des potentiels d'action. (Mc Donald, 1982 ; Lee et Tsien, 1982, 1983 ; Mitchell, 1983 ; Stephenson, 1983). De même, les cellules ventriculaires possèdent une composante lente de courant entrant de Ca plus marquée que les cellules des noeuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire (Gettes et Reuter, 1974 ; Beeler et Reuter, 1977 ; Reuter et Scholz, 1977 ; Mc Donald et Trautwein, 1978 ; Noma et al, 1980).

## 2) Rôle des influx calciques dans le couplage excitation-contraction.

### A) Rôles des courants calciques entrants rapide et lent dans le couplage excitation-contraction.

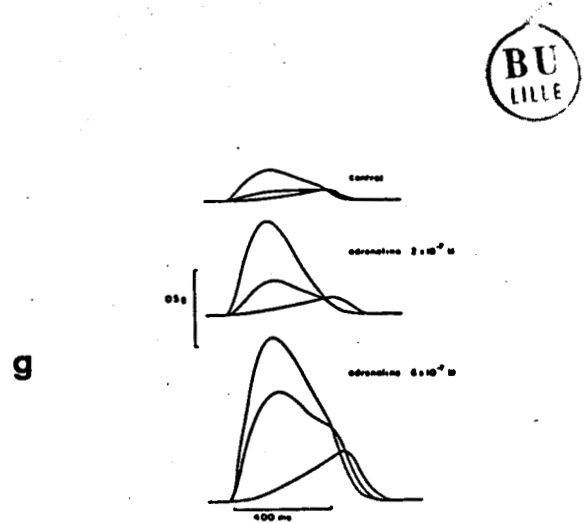
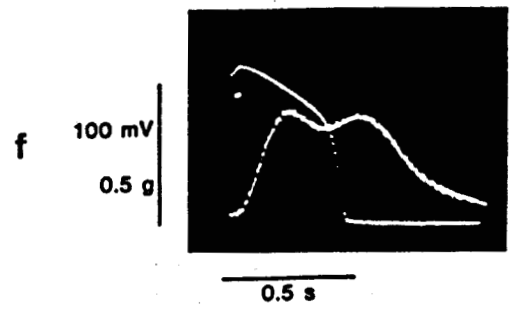
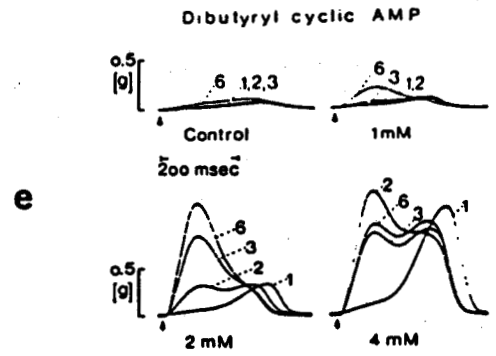
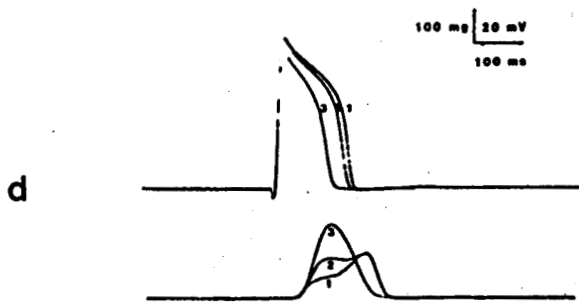
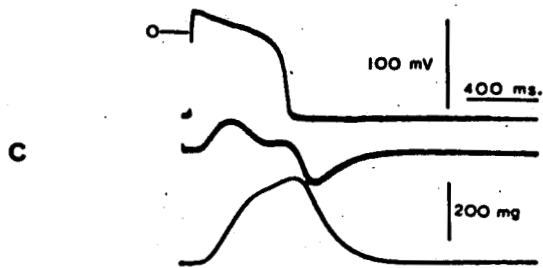
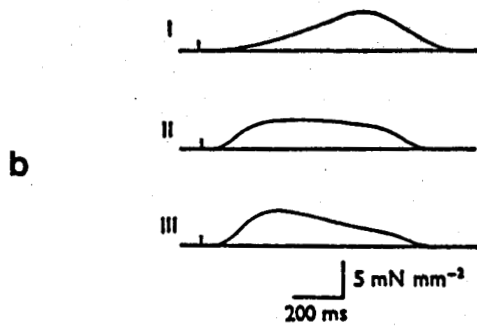
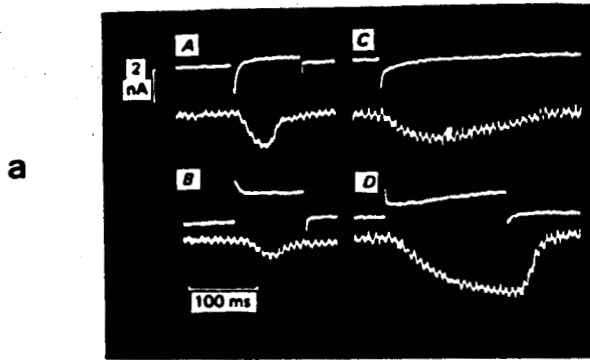
En étudiant l'effet de "microinjections" de Ca qui simulent la cinétique des deux courants calciques, Fabiato (1985) montre sur des fibres pelées de Purkinje que le courant calcique entrant rapide déclenche la contraction selon le mécanisme de Ca-induced Ca release (libération de Ca par le RS déclenchée par l'entrée de Ca) (fig 10). Fabiato et Fabiato (1979), Fabiato (1982, 1983, 1985) montrent en outre que le mécanisme de Ca-induced Ca release n'est pas dû à une variation en valeur absolue de la concentration de Ca extraréticulaire mais plutôt à la vitesse de cette variation. Fabiato (1985) montre aussi que le courant lent entrant de Ca servant à la recharge du RS permet d'augmenter l'amplitude de la contraction suivante du fait d'une libération accrue de Ca par le RS, cette libération étant elle même déclenchée par le courant entrant rapide de Ca.

Fabiato (1985) montre que le courant calcique rapide ne produit plus aucune contraction lorsque le RS des fibres pelées est préalablement détruit par un traitement par le Brij alors qu'au contraire le courant entrant lent produit une tension mécanique qui peut en outre être maintenue (fig 10c). Cet auteur conclut que la tension produite dans ces conditions est indépendante de la vitesse à



laquelle la solution calcique est mise au contact de la fibre musculaire pelée. Il apparaît donc évident que le Ca véhiculant le courant entrant lent peut provoquer une contraction par activation directe des protéines contractiles. Lee et al (1983) montrent en conditions de potentiel imposé que le courant entrant lent peut être à l'origine d'une composante de contraction maintenue et Mitchell (1983) (fig 11a) observe, sur des cellules isolées de cobaye, que le courant entrant lent de Ca est aussi à l'origine d'une contraction alors que celle-ci est inexistante dans le cas des cellules myocardiques de rat dépourvues de canaux lents (Josephson et al, 1984) (fig 5c)

Plusieurs auteurs décrivent des contractions biphasiques. Ainsi Allen et al (1974) proposent que les deux composantes de contraction soient dues à la libération de Ca par le RS (fig 11b). Par contre Seibel (1978) attribue la première composante à une libération de Ca par le sarcolemme et la seconde à une libération de Ca par le RS (fig 11e). Beresewicz et Reuter (1977), Bogdanov (1978) et plus récemment King et Bose (1983), Malécot et al (1984), Honoré et Challice (1985, 1986) et Honoré et al (1986a,b,c) décrivent des contractions biphasiques et imputent en accord avec les données de la littérature, la première composante à une libération de Ca par le RS et la seconde composante à une activation directe des protéines contractiles par le Ca entrant dans la cellule via le canal calcique (Isi) (fig 11).



B) Rôle de l'influx de Ca via l'échange Na-Ca dans le couplage excitation-contraction.

Ces contractions biphasiques ne semblent pas correspondre aux contractions à deux composantes décrites dès 1972 par Vassort et Rougier. Ces auteurs montrent que la contraction des cellules auriculaires de grenouille induites par une dépolarisation correspond à deux composantes : l'une phasique dépendant directement du courant lent entrant ( $I_{sl}$ ), l'autre tonique dépendant de l'échange Na-Ca (fig 12d). Une relation directe entre le courant calcique entrant et l'amplitude de la contraction phasique a été démontrée sur le myocarde de grenouille par Beeler et Reuter (1970), Léoty et al (1970), Gibbons et Fozzard (1971, 1975), Vassort et al (1971), Einwachter et al (1972), New et Trautwein (1972), Horackova et Vassort (1976, 1979), Horackova (1984). La relation entre le courant entrant et la contraction phasique apparaît complexe dans le myocarde de mammifère, du fait de l'importance du RS (Horackova 1984). Quant à la composante tonique, elle est observée tant sur le myocarde de grenouille (Vassort et al, 1971 ; Vassort et Rougier, 1971 ; Léoty et Raymond, 1972 ; Einwachter et al, 1972 ; Vassort, 1973 ; Benniger et al, 1976 ; Horackova et Vassort, 1972, 1974, 1978, 1979) que sur le myocarde de mouton et de veau (Mc Guigan, 1968 ; Wood et al, 1969), de chat (New et Trautwein, 1972 ; Trautwein et al, 1975), de cobaye (Ochi et Trautwein, 1971) et sur les fibres de Purkinje (Coraboeuf et al, 1981 ; Eisner et al, 1983).

Vassort (1973) montre sur la fibre auriculaire de grenouille la nécessité de la présence de Na et de Ca dans le déclenchement de la



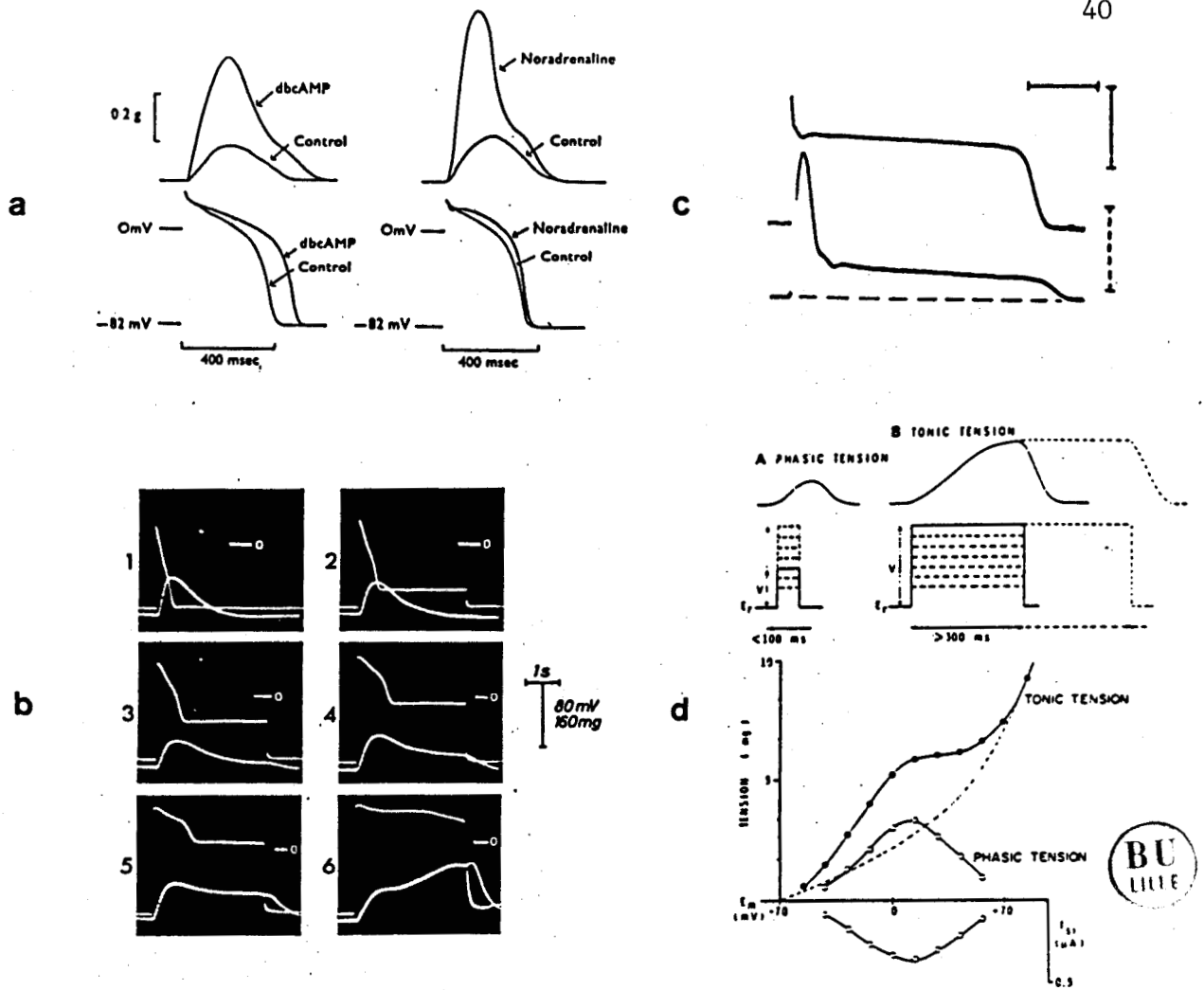


Fig 12 :

a) D'après Reuter (1974)

Effet du dbAMPc et de la noradrénaline sur le potentiel d'action et sur la contraction du trabécule ventriculaire de veau.

b) D'après Morad et Trautwein (1968)

Effet d'une prolongation de la durée du potentiel d'action sur la contraction du trabécule ventriculaire de mouton.

c) D'après Coraboeuf et al (1975)

Effet de la toxine II du venin de scorpion sur le potentiel d'action et la contraction du muscle papillaire de rat.

d) D'après Horackova (1984)

Mise en évidence d'une composante tonique et d'une composante phasique sur la fibre auriculaire de grenouille.

composante tonique. De plus, Horackova et Vassort (1972, 1974) puis Hønerjager et Reiter (1975) montrent que la vératridine, qui augmente la concentration intracellulaire de Na, accroît l'amplitude de la composante tonique. Selon ces auteurs la composante tonique serait liée à un influx de Ca via l'échange Na-Ca et dépendrait fortement de l'activité du Na intracellulaire. De même, Morad et Trautwein (1968), Braveny et Sumbera (1970), Reuter (1974), Coraboeuf et al (1975) décrivant une contraction à deux composantes du muscle papillaire de mammifère attribuent la première à une libération de Ca par le RS et la seconde à un influx de Ca via l'échange Na-Ca (fig 12).

L'analyse approfondie des données de la littérature relative à la relation liant les activités électrique et mécanique des cellules myocardiques met en évidence 3 mécanismes possibles responsables d'une entrée de Ca dans la cellule et pouvant être plus ou moins reliés au développement de l'activité mécanique : deux courants entrants de calcium (rapide et lent) correspondant chacun au développement d'une contraction phasique ou "maintenue" et un influx de Ca via l'échange Na-Ca correspondant au développement d'une composante tonique.

Le but de ce travail a été de montrer que les deux influx de Ca via les deux types de canaux calciques sont bien à l'origine, respectivement, des deux composantes de contraction (obtenues en milieu hyperpotassique et en présence d'isoprotérénol) indépendantes du mécanisme d'échange Na-Ca.

## MATERIEL ET METHODE

Les expériences sont réalisées sur des fragments de coeurs de cobaye, de rat et de grenouille "taureau" adultes. Les animaux sont assommés puis saignés. Leur coeur est rapidement prélevé et plongé dans une solution de Tyrode oxygénée par un mélange de 95% d'oxygène et de 5% de dioxyde de carbone. Un muscle papillaire du ventricule droit (coeurs de rat et de cobaye) ou un trabécule (ventricule de grenouille) est disséqué avec soin en évitant au maximum tout traumatisme. La préparation est placée dans une cuve de 3 ml et perfusée à débit constant (3ml/min) par une solution oxygénée de Tyrode. Le pH de cette solution est de  $7.35 \pm 0.01$ . En normoxie, la  $PO_2$  a pour valeur  $575 \pm 10$  mm Hg et la  $PCO_2$   $34 \pm 2$  mm Hg. La température est maintenue constante grâce à un système thermostatique ( $36^\circ C$  pour le muscle papillaire de mammifère et  $22^\circ C$  pour le trabécule de grenouille). La partie tendineuse du muscle papillaire est accrochée, par l'intermédiaire d'un levier en acier inoxydable, à un transducteur (Bioscience, UF1) fixé à un micromanipulateur. L'autre extrémité du muscle papillaire est fixée à l'aide de fines aiguilles d'entomologiste sur le fond de la cuve expérimentale.

La composition des solutions utilisées est donnée dans le tableau 1. Les substances pharmacologiques sont ajoutées aux différentes solutions précédemment décrites. Leur origine est la suivante : caféine : Sigma ; procaïne : Lavoisier ; isoprotérénol : Winthrop ; nifédipine : Bayer ; TEA : Merck ; TTX : Sigma ; Mn : Sigma ; Cd : Prolabo ; BAY K 8644 : Bayer ; acétylcholine : Lematte et Boinot.

	Na	Li	TEA	K	Cl	Ca	Mg	Sr	Ba	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Isop.	Gluc
Solution de Tyrode	135	0	0	4	117.8	1.8	1	0	0	1.8	25	0	11
Solution hyperpotassique	122	0	0	17	117.8	1.8	1	0	0	1.8	25	0	11
Solution de référence	122	0	0	17	117.8	1.8	1	0	0	1.8	25	3.10 <sup>-7</sup>	11
Solution sans Na	0	122	0	17	117.8	1.8	1	0	0	1.8	25	3.10 <sup>-7</sup>	11
Solution pauvre en Na	25	97	0	17	117.8	1.8	1	0	0	1.8	25	3.10 <sup>-7</sup>	11
Solution pauvre en Na avec 60 mM de TEA	25	37	60	17	117.8	1.8	1	0	0	1.8	25	3.10 <sup>-7</sup>	11
Solution avec Sr	122	0	0	17	117.8	0	1	1.8	0	1.8	25	0	11
Solution avec Ba	122	0	0	17	117.8	0	1	0	1.8	1.8	25	0	11

Tableau 1 : Composition des solutions utilisées  
(donnée en mM).



- Stimulation, enregistrement des activités électrique et mécanique.

Les préparations sont stimulées électriquement par l'intermédiaire d'une électrode de platine (0.2 mm de diamètre) isolée jusqu'à son extrémité et d'un stimulateur GP1-GE219-CRE. La durée de la stimulation est de 5 ms et l'intensité choisie est double de l'intensité seuil. Les potentiels d'action sont enregistrés au moyen d'une microélectrode de verre étiré remplie de KCl 3M (voir schéma synoptique). La résistance de pointe est de 10 à 15 megohms. La microélectrode est reliée à un adaptateur d'impédance (WPI, modèle 750). L'électrode indifférente impolarisable est constituée d'un fil d'argent chloruré et d'un pont de KCl 3M gélosé. L'amplificateur opérationnel 2 est utilisé pour maintenir le potentiel extracellulaire au potentiel de terre. Le courant de stimulation mesuré par l'intermédiaire de la chute de tension qu'il provoque aux bornes de la résistance R est comparé à celui délivré par un générateur de tension rectangulaire par l'intermédiaire de l'amplificateur opérationnel 1. La vitesse maximale de dépolarisation est mesurée grâce à un circuit RC différenciateur dont les caractéristiques sont les suivantes :  $R = 120$  kohm ;  $C = 33$  nF. Les contractions sont mesurées à l'aide d'un transducteur (Bioscience UF1) relié à son amplificateur . Le potentiel d'action et la contraction sont enregistrés sur un oscilloscope à mémoire Tektronix 5111. Les traces mémorisées sont photographiées.

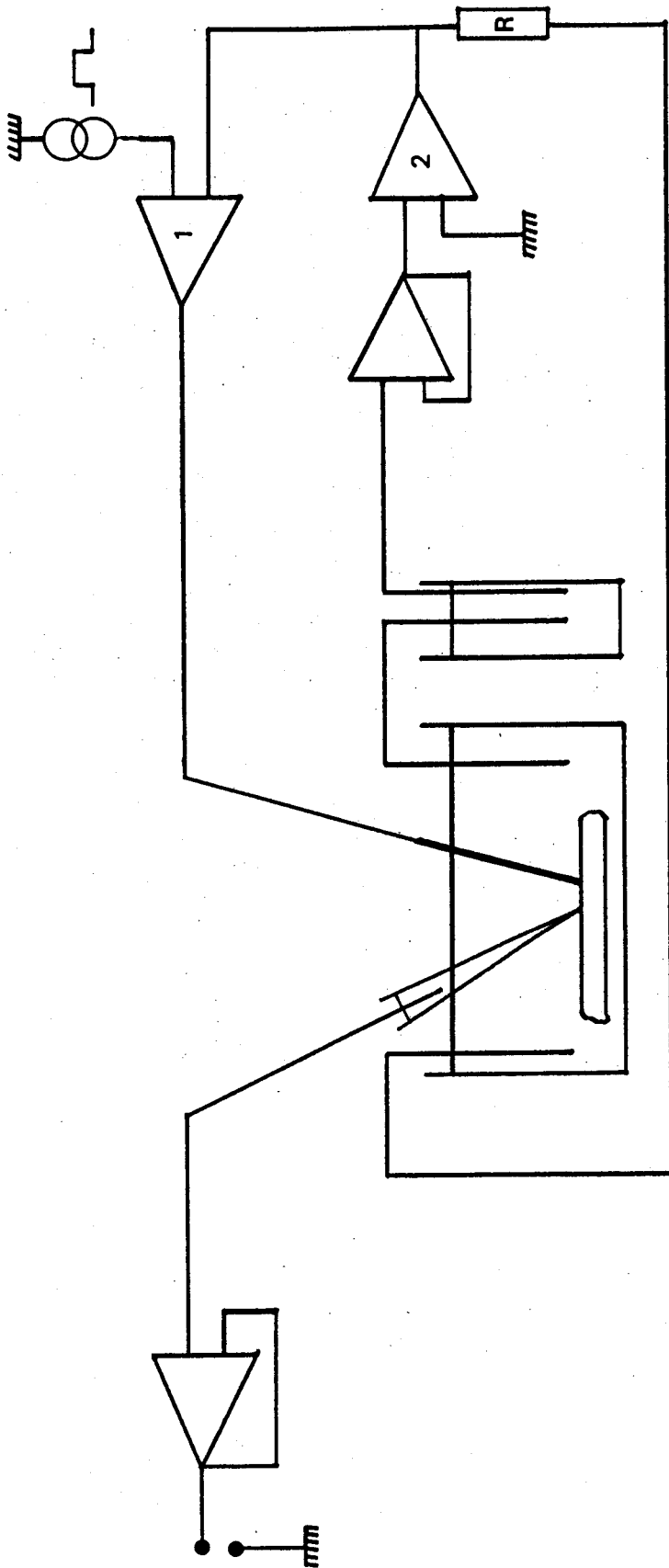


Schéma synoptique du montage utilisé.

## - Protocole expérimental

Le muscle papillaire est étiré avec précaution grâce au micromanipulateur sur lequel est fixé le transducteur, jusqu'à ce que soit atteinte la contraction d'amplitude maximale (maximum de la relation tension-longueur). Puis le muscle est stabilisé en solution de Tyrode pendant 120 minutes. Durant cette période, le muscle est stimulé à une fréquence de 0.6 Hz. La préparation est ensuite perfusée par la solution hyperpotassique (17 mM) pendant 10 minutes ce qui conduit à l'inexcitabilité cellulaire. L'isoprotérénol est alors ajouté à la concentration de  $3.10^{-7}$  M à la solution hyperpotassique (solution de référence) pour restaurer l'excitabilité cellulaire. Après 20 minutes de stabilisation dans ces nouvelles conditions, les différentes substances pharmacologiques à étudier sont ajoutées à la solution de référence.

Les différents paramètres mesurés sont les suivants :

- l'amplitude, l'inversion de potentiel, la durée à 50% de la repolarisation, le potentiel diastolique du potentiel d'action.
- l'amplitude et le temps au pic de contraction de chacune des composantes de contraction.

Les résultats sont exploités à l'aide des appareils suivants : HP 85, MACINTOSH, APPLE 2. Ils sont présentés sous forme de moyennes affectés de leur erreur standard. n représente le nombre d'expériences réalisées dans chaque protocole expérimental.

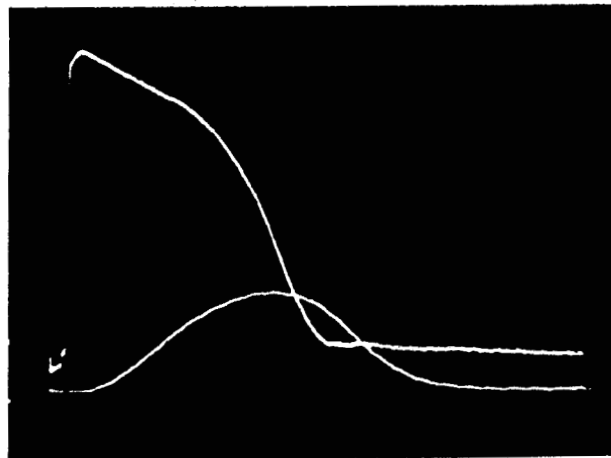
## RESULTATS

- Obtention de la contraction biphasique (n = 32).

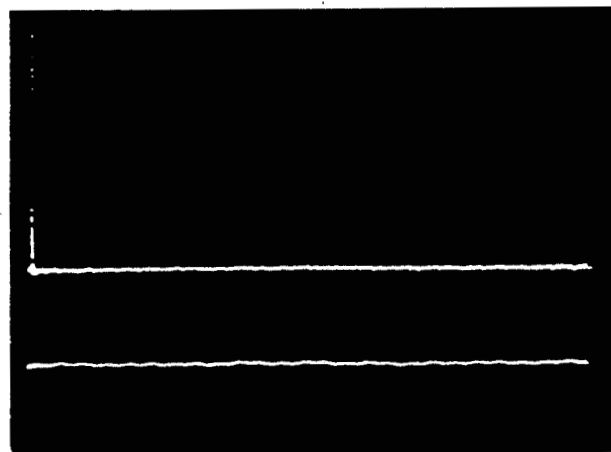
L'augmentation de la concentration extracellulaire en K produit une dépolarisation membranaire qui entraîne l'inexcitabilité cellulaire (fig 13b). Dans ces conditions, la cellule myocardique présente un potentiel diastolique de  $-54 \pm 0.9$  mV. L'addition d'isoprotérénol à la solution hyperpotassique restaure l'excitabilité cellulaire (fig 13c). A la fréquence de stimulation de 0.6 Hz, le potentiel d'action dans ces dernières conditions, présente une vitesse de dépolarisation de  $13.5 \pm 0.9$  V/s et une durée mesurée à 50% de la repolarisation de  $172 \pm 9.1$  ms. La contraction induite dans ces conditions présente un décours biphasique (fig 13c). La première composante de contraction présente un temps au pic de contraction de  $90 \pm 4.8$  ms et une amplitude similaire à celle enregistrée en solution de Tyrode ( $54 \pm 7$  mg). Le temps au pic de contraction de la seconde composante est comparable à celui des contractions qui peuvent être enregistrées en solution de Tyrode après 15 minutes de quiescence ( $190 \pm 14.6$  ms). Son amplitude est environ deux fois supérieure à celle de la première composante ( $117 \pm 12$  mg). Quelques préparations (environ 5% des cas) présentent en plus des deux composantes de contraction une post-contraction déclenchée par un post-potentiel pour des concentrations d'isoprotérénol supérieures à  $1 \mu\text{M}$ . Le retour aux conditions initiales (solution de Tyrode) conduit au développement d'une contraction monophasique.



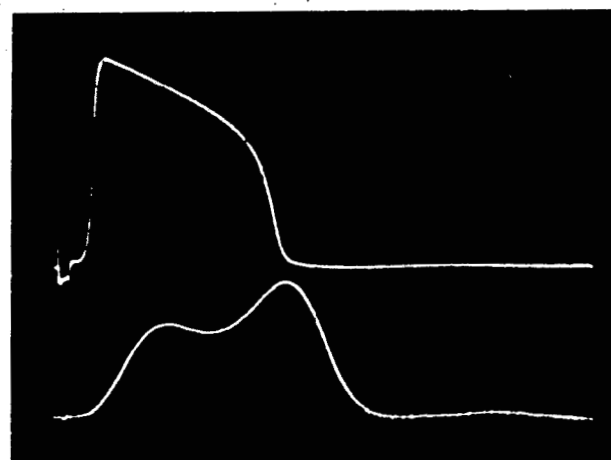
a



b



c



0,1g | 40mV  
100ms

Fig 13 :

Enregistrement d'une contraction biphasique en milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol.

a) Solution de Tyrode

b) Solution hyperpotassique (17 mM)

c) Solution hyperpotassique additionnée d'isoprotérénol  $3.10^{-7}$  M.

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz.

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

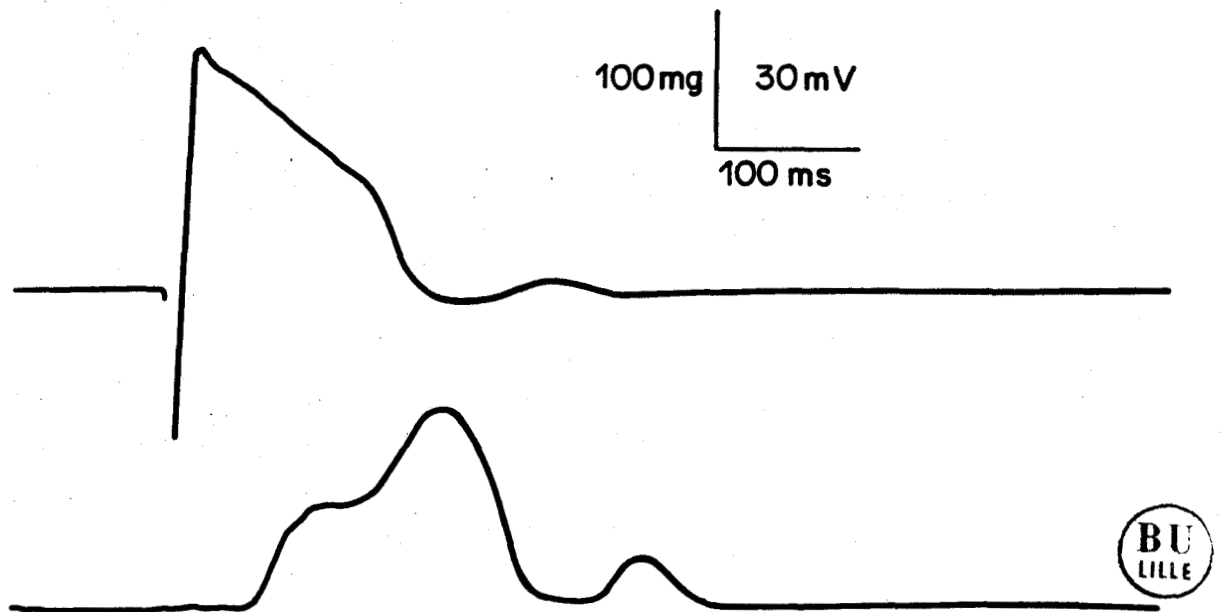


Fig 14 :

Enregistrement d'une contraction biphasique en milieu hyperpotassique (17 mM) additionné d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M).

Le potentiel d'action présente un post-potentiel qui déclenche une post-contraction.

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz.

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

- Maintien des deux composantes de contraction en milieu inhibant l'échange Na-Ca (n=5).

Dans le but de déterminer l'origine des deux composantes de contraction, l'échange Na-Ca est rendu inopérant. Pour ce faire, le NaCl de la solution de référence est remplacé par du LiCl. Cette manoeuvre entraîne des modifications immédiates et importantes du décours du potentiel d'action et de la contraction (fig 15) : le potentiel d'action se raccourcit et l'amplitude des deux composantes de contraction augmentent. Pendant les 5 premières minutes de perfusion, l'amplitude de la première composante devient supérieure à celle de la seconde et une post-contraction apparaît (fig 15b). Après cette période, les deux composantes de contraction fusionnent et une contracture se développe graduellement au cours du temps entraînant ainsi l'inexcitabilité cellulaire (fig 15e et 16). Le retour aux conditions initiales (solution de référence) provoque une disparition progressive de la contracture et une restauration de l'excitabilité cellulaire (fig 15f et 15g). La réapparition de la première composante précède toujours celle de la seconde (fig 15f), cette dernière étant toujours contemporaine de l'augmentation de l'amplitude et de la durée du potentiel d'action (fig 15g).

L'inhibition de l'échange Na-Ca par la solution dépourvue de Na entraîne des modifications importantes de l'activité électrique et mécanique. Une contracture se développe après 5 minutes de perfusion provoquant l'inexcitabilité cellulaire. Du fait de la contracture qui se développe dans ces conditions, il ne nous est pas possible de conclure quant à la dépendance des deux composantes de contraction

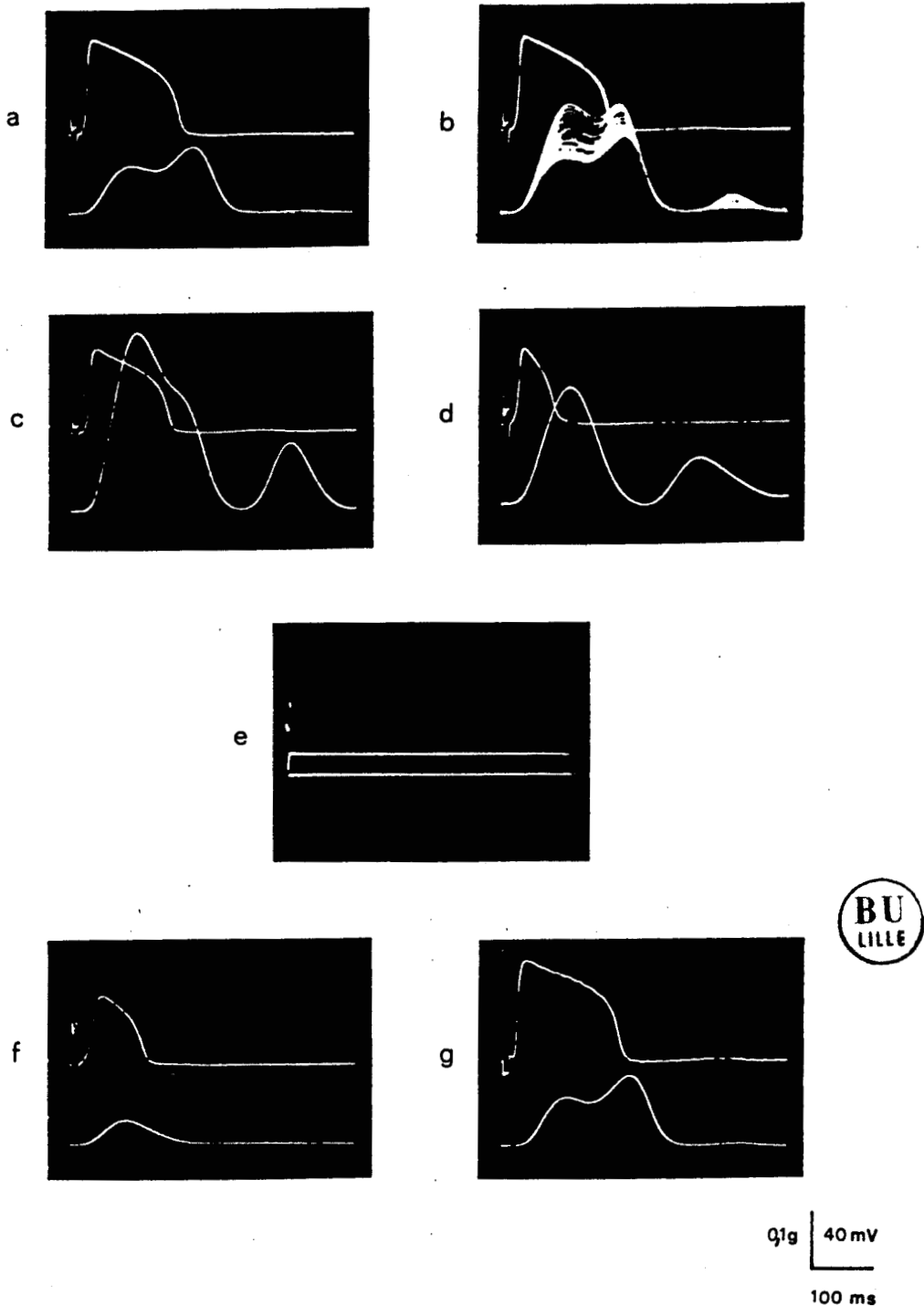


Fig 15 :

Effet de la suppression du Na extracellulaire sur la contraction biphasique

- a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)
- b) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) sans Na pendant 1 minute
- c) idem après 3 minutes
- d) idem après 8 minutes
- e) idem après 15 minutes
- f) Retour solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol après 8 minutes
- g) idem après 16 minutes

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

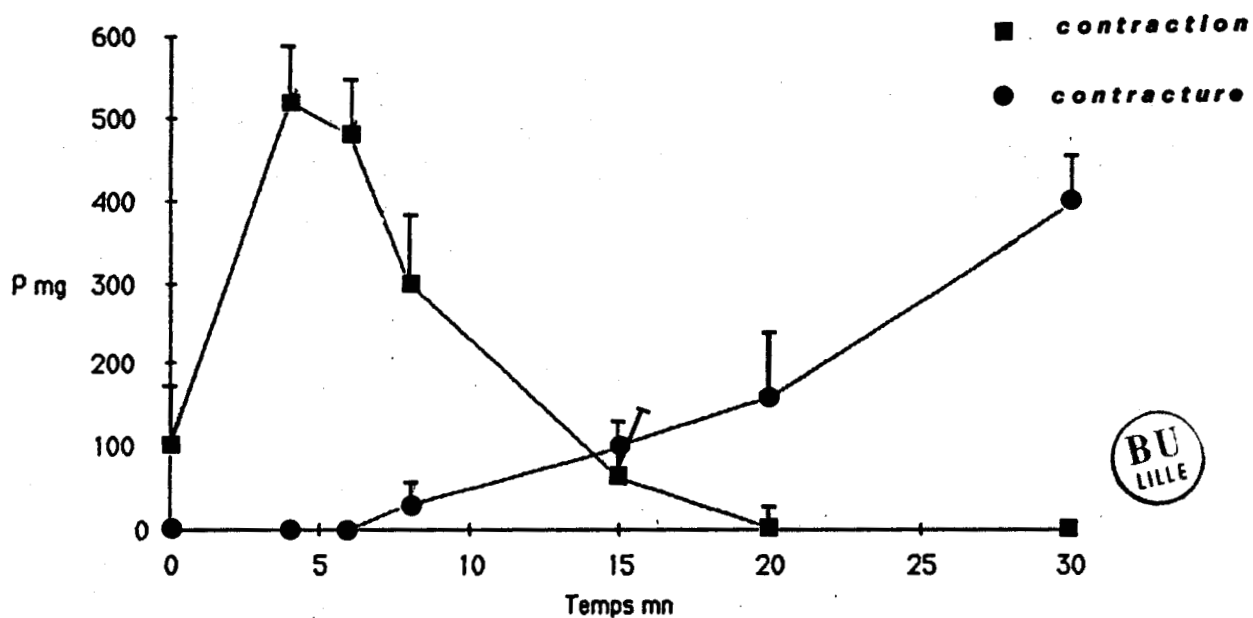


Fig 16 :

Evolution au cours du temps de l'amplitude de la contraction et de la contracture en milieu hyperpotassique (17 mM) additionné d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) sans Na.

vis-à-vis de l'échange Na-Ca. Dans le but d'éviter le développement de cette contracture, l'expérience a été réalisée en présence de 25 mM de NaCl.

- Evolution des deux composantes de contraction en milieu inhibant partiellement l'échange Na-Ca (n = 6).

Une solution contenant 25 mM de Na est perfusée après obtention de la contraction biphasique en solution de référence (fig 17b). Comme le montre la figure 17, les deux composantes de contraction augmentent durant les 5 premières minutes. Les deux composantes de contraction fusionnent dès la cinquième minute de perfusion. Ces modifications du décours de la contraction sont contemporaines d'une diminution de la durée du potentiel d'action. Puis après 30 minutes, l'amplitude de la contraction se stabilise finalement à un niveau supérieur au niveau initial (fig 18 et 17e). Aucune contracture ne se développe et les paramètres électriques et mécaniques sont stables. Le temps au pic de contraction est de  $103 \pm 9$  ms correspondant au temps au pic de contraction de la première composante de contraction ( $90 \pm 4.8$  ms). Le retour aux conditions initiales (solution de référence) entraîne une nette diminution de l'amplitude de la contraction (fig 17f). La contraction biphasique réapparaît ensuite et recouvre ses caractéristiques initiales après 30 minutes de perfusion (Fig 17g).

Les activités électrique et mécanique enregistrées en solution hyposodique (25 mM de Na) se stabilisent après quelques minutes de perfusion. Grâce probablement à un reliquat d'échange Na-Ca, il n'apparaît aucune contracture. Cependant, les deux composantes de

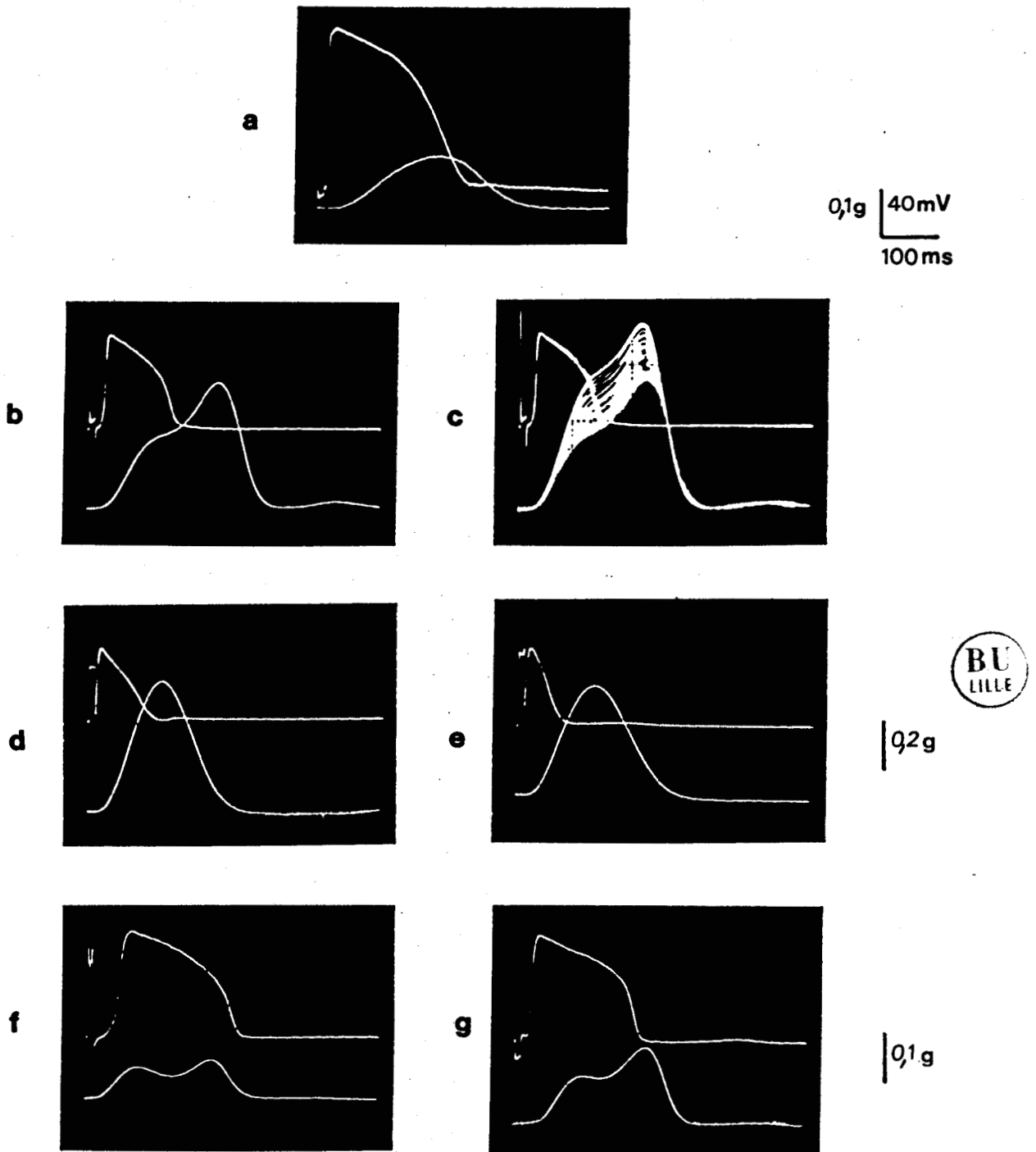


Fig 17 :

Effet de la réduction de la concentration extracellulaire en Na (25 mM) sur la contraction biphasique.

a) Solution de Tyrode

b) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

c) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) avec 25 mM de Na pendant 1 minute

d) idem après 6 minutes

e) idem après 30 minutes

f) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) après 6 minutes

g) idem après 14 minutes

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

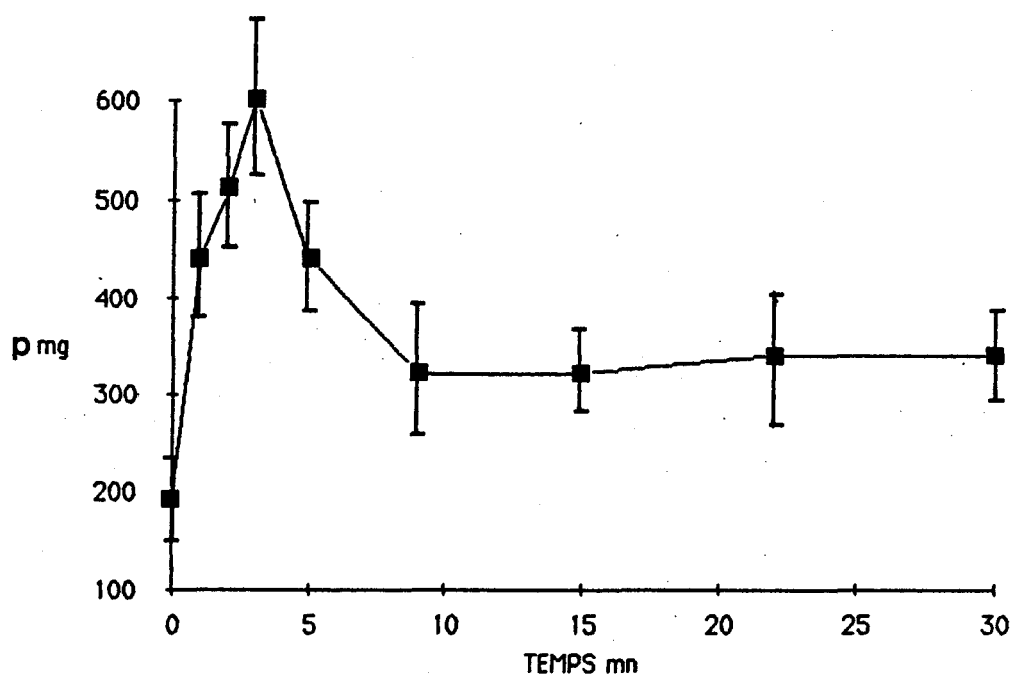
BU  
LILLE

Fig 18 :

Evolution au cours du temps de l'amplitude de la contraction en milieu hyperpotassique (17 mM) additionné d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) et en présence de 25 mM de Na.



contraction fusionnent. La durée du potentiel d'action est fortement réduite, empêchant le développement de la seconde composante. La dépendance de la contraction biphasique vis-à-vis de l'échange Na-Ca ne peut toujours pas être clairement établie. Afin de démontrer le rôle éventuel de l'échange Na-Ca, la même expérience a été réalisée à nouveau, en présence de TEA et en milieu hyposodique. Le TEA a pour effet notamment de prolonger la durée du potentiel d'action par le blocage du courant sortant potassique retardé qui contrôle la durée du potentiel d'action.

- Evolution des deux composantes de contraction en milieu hyposodique contenant différentes concentrations de TEA (n = 3)

Les effets du TEA sont analysés à différentes concentrations pour montrer l'importance de l'inhibition du courant sortant potassique sur le développement de la seconde composante de contraction. La figure 19 montre que l'accroissement de la concentration en TEA entraîne en milieu hyposodique une augmentation de la durée du potentiel d'action et un net démasquage de la seconde composante de contraction. Pour de fortes concentrations de TEA, un post-potentiel et une post-contraction apparaissent (fig 19g).

L'origine de chacune des deux composantes de contraction, semble être indépendante d'un influx calcique via l'échange Na-Ca. De plus il apparaît que le démasquage de la seconde composante est d'autant plus net que la durée du potentiel d'action est plus allongée.

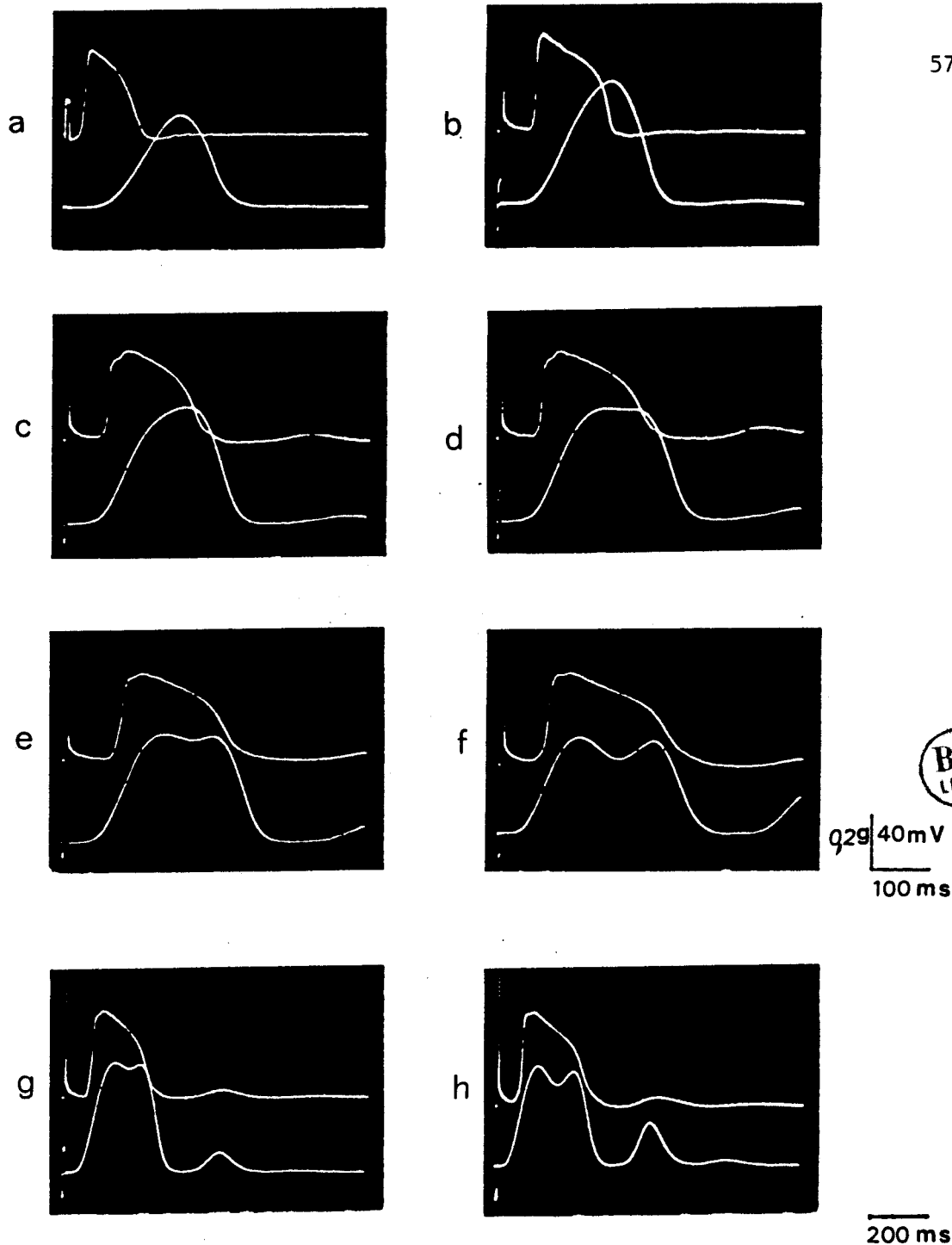


Fig 19 :

Effet des ions TEA sur la contraction enregistrée en milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol et en présence de 25 mM de Na.

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) en présence de 25 mM de Na

b) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) en présence de 25 mM de Na et 10 mM de TEA après 15 minutes

c) idem avec 20 mM de TEA

d) idem avec 30 mM de TEA

e) idem avec 40 mM de TEA

f) idem avec 60 mM de TEA

g) idem avec 40 mM de TEA

h) idem avec 60 mM de TEA

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

Dans la mesure où il est maintenant admis qu'au niveau de nombreuses structures, deux types de canaux calciques existent, en particulier au niveau des cellules cardiaques (Noble 1984 ; Hume et Giles 1983 ; Bean 1985 ; Nilius et al 1985 ; Lee et al 1985), il est permis de penser que les deux composantes de contraction sont liées à deux influx calciques empruntant deux types de canaux calciques.

La dépendance des deux composantes de contraction vis-à-vis du potentiel de membrane a été étudiée pour démontrer l'existence de ces deux types de canaux.

- Dépendance des deux composantes de contraction vis-à-vis du potentiel de membrane (n = 5).

Les préparations, placées en solution de Tyrode normal, sont progressivement dépolarisées par élévation graduelle de la concentration extracellulaire en K (de 4 à 33 mM) en présence d'isoprotérénol ( $3.10^{-7}$  M). Pour un léger excès de K extracellulaire (6 mM) les deux composantes de contraction sont fusionnées (fig 20a). Dans ces conditions la contraction présente un plateau. Les deux composantes apparaissent plus distinctement aux concentrations supérieures à 6 mM (fig 20b, 20c, 20d), l'amplitude de la première composante étant inférieure à celle de la seconde. Pour des concentrations de K supérieures à 25 mM, la première composante est inhibée et l'amplitude de la seconde réduite (fig 20f). Ceci peut s'expliquer par la forte dépolarisation membranaire entraînée par l'excès de K. Cette

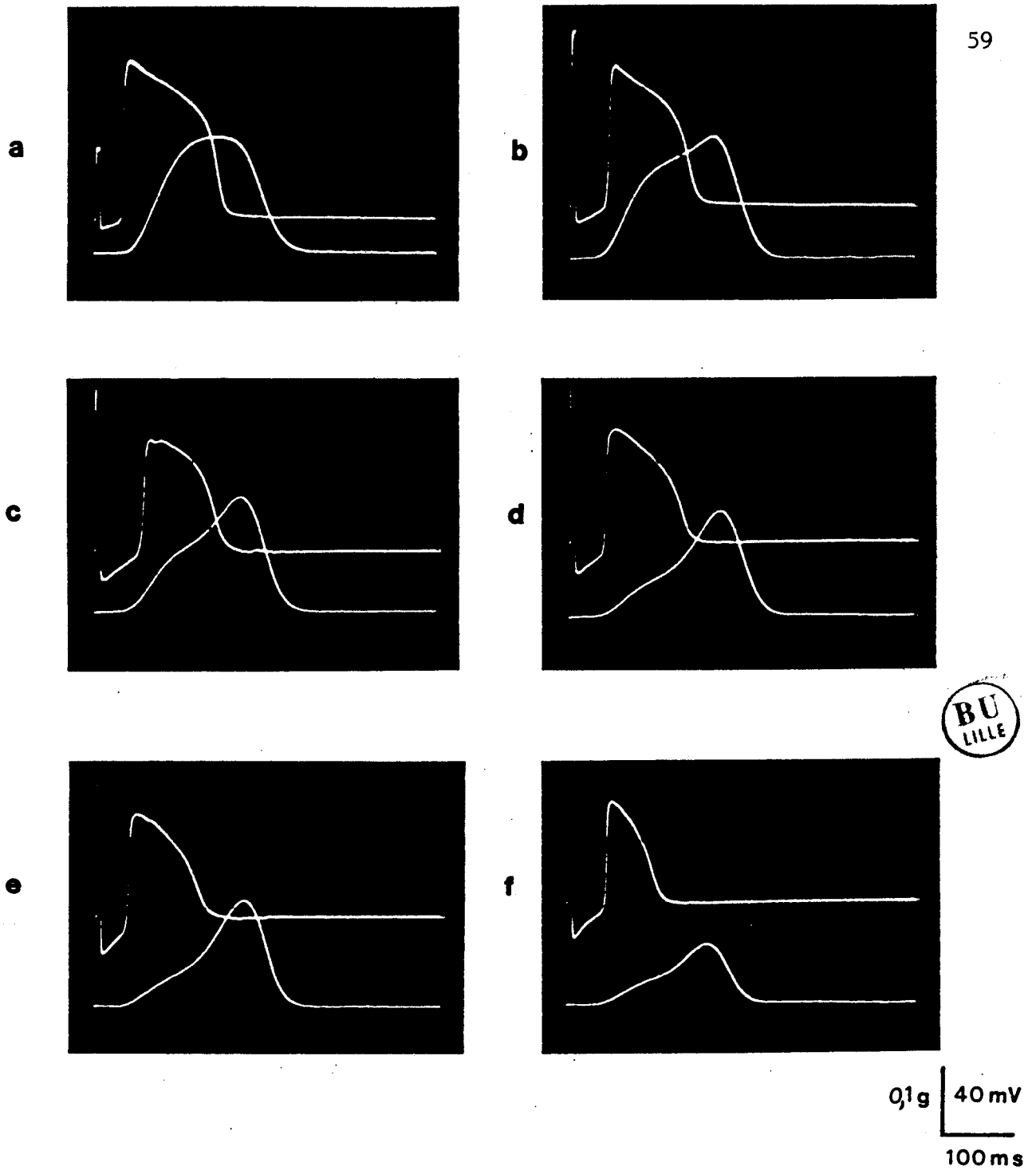


Fig 20 :

Effet du potentiel de membrane sur la contraction biphasique

a) solution hyperpotassique (6 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

b) idem avec 12 mM de K

c) idem avec 17 mM de K

d) idem avec 22 mM de K

e) idem avec 25 mM de K

f) idem avec 33 mM de K

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

diminution du potentiel de membrane aurait pour effet de diminuer la disponibilité de la conductance calcique.

Cette observation est en accord avec les résultats de Bean (1985) qui démontre l'existence de deux courants calciques entrants correspondant, en fait, à deux types de canaux calciques. Dans cette perspective, l'influence du potentiel de membrane sur l'amplitude des deux composantes de contraction a été analysée. Comme le montre la figure 21, la relation liant le rapport de l'amplitude normalisée de chaque composante de contraction au potentiel de membrane diastolique (fonction de la concentration externe en K) peut traduire la relation liant la disponibilité de chaque conductance calcique au potentiel de membrane. La figure 21 montre que le rapport de l'amplitude normalisée de chaque composante de contraction en fonction du potentiel de membrane diastolique est de type sigmoïde. Toutefois, la première composante de contraction disparaît pour un potentiel de membrane nettement plus négatif que la seconde. La valeur de  $E_m$  correspondant à la demi-disponibilité de la première composante de contraction est de  $-47$  mV, valeur que l'on peut rapprocher de celle ( $-41$  mV) trouvée par Bean (1985) lorsqu'il décrit l'inactivation en fonction du potentiel de la conductance calcique rapide. En ce qui concerne la seconde composante, la valeur de  $E_m$  correspondant à la demi disponibilité est de  $-36$  mV.

Il semble que les relations liant l'amplitude normalisée des 2 composantes de contraction au potentiel de membrane diastolique traduisent bien la disponibilité des conductances calciques en fonction du potentiel de membrane et que les deux composantes phasiques de

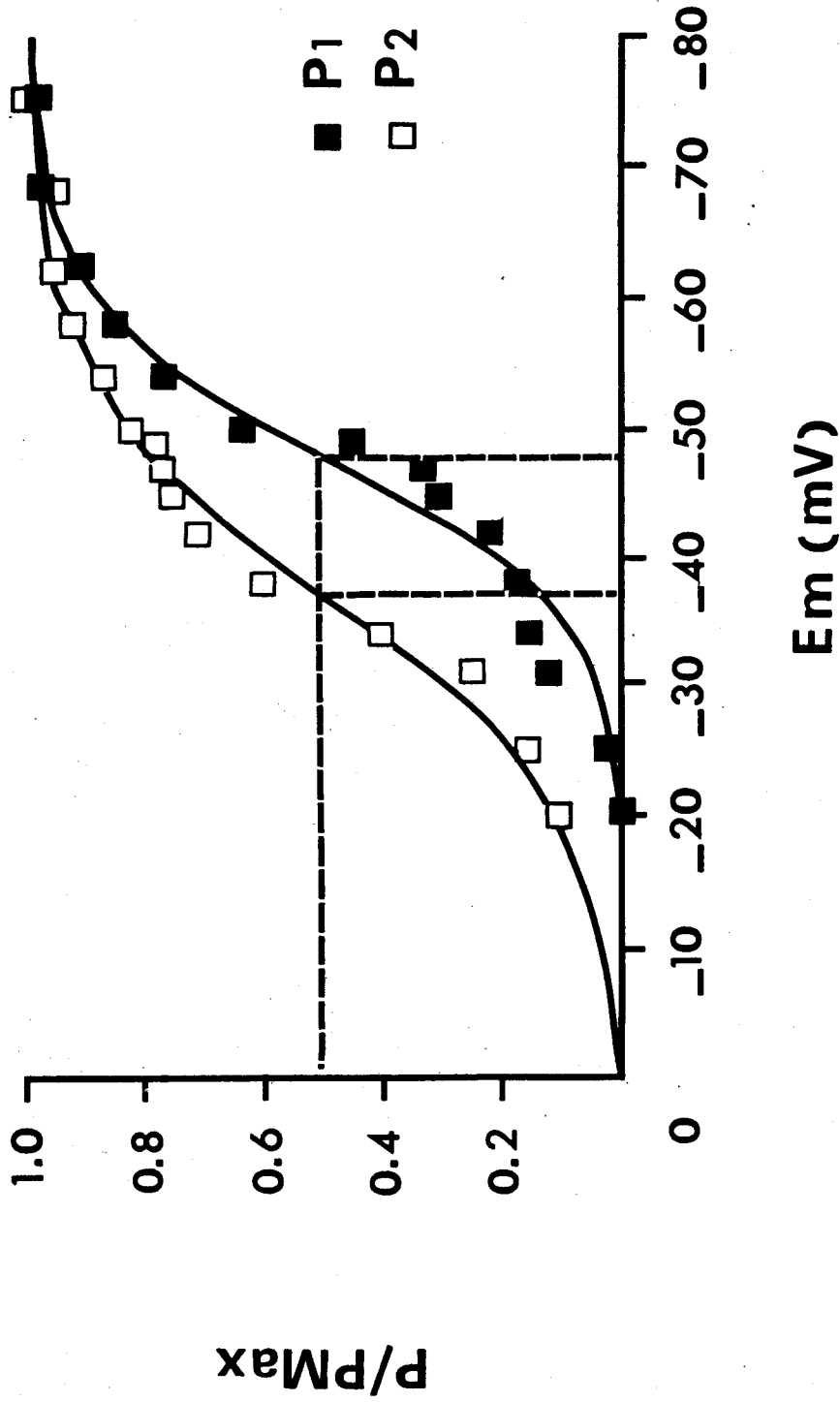


Fig 21 :

Evolution des amplitudes normalisées des deux composantes de contraction en fonction du potentiel diastolique.  
 Les relations sont décrites par l'équation  $P/P_{Max} = 1 / \{1 + e^{(E_m - E_k) / k}\}$  avec pour P1 :  $E_k = -47$  mV,  $k = 5.0$  ; pour P2 :  $E_k = -36$  mV,  $k = 8.2$ .

contraction correspondraient à deux influx calciques passant par deux types de canaux différents. Il est intéressant de noter que la valeur de  $k$  dans l'équation traduisant la relation liant la disponibilité de la conductance calcique rapide au potentiel de membrane donnée par Bean (1985) est de 4,8 ; cette valeur est extrêmement voisine de celle déterminée dans ce travail pour la première composante de contraction ( $k = 5$ ). Pour une concentration extracellulaire en K de 25 mM, la disponibilité de la première composante n'est que de 10% alors que celle de la seconde composante est encore de 55%.

Ces résultats montrent en outre que l'échange Na-Ca n'est pas impliqué dans la contraction biphasique et semblent renforcer l'hypothèse selon laquelle, deux influx différents de calcium déclenchés lors du potentiel d'action lent seraient à l'origine des deux composantes de contraction. D'autre part, un influx sodique ne pourrait être invoqué pouvant conduire au mécanisme de Na-induced Ca release (Bonvallet et al, 1985 ; Harrisson et Miller, 1985). En effet puisque le potentiel d'action, dans nos conditions expérimentales, est de  $-54 \pm 0,9$  mV du fait de l'élévation de la concentration extracellulaire en K, on pourrait invoquer une certaine disponibilité de la conductance sodique. Pour s'assurer de l'absence d'effet de l'influx sodique à ce niveau de potentiel membranaire dans le déclenchement de la contraction biphasique, des expériences sont réalisées dans les mêmes conditions mais en présence de TTX qui bloque totalement l'influx sodique.

- Indépendance des deux composantes de contraction vis-à-vis de l'influx sodique rapide (n = 5).

Dans nos conditions expérimentales (K 17 mM, isoprotérénol  $3.10^{-7}$  M), la vitesse maximale de dépolarisation est de  $13,9 \pm 1,8$  V/s. Cette valeur témoigne d'une absence presque totale de la participation d'un courant sodique à la phase de dépolarisation. Après addition de  $10^{-5}$  M de TTX à la solution de référence, la vitesse maximale de dépolarisation est de  $12,3 \pm 1,6$  V/s. Comme le montrent les tracés de la figure 22d, l'amplitude des deux composantes de contraction n'est réduite que d'environ 10 % en présence de TTX. Cette diminution d'amplitude des deux composantes de contraction en présence de TTX peut s'expliquer par la suppression totale de deux mécanismes : 1) Na-induced Ca release (Harrisson et Miller, 1985 ; 2) modification de l'activité intracellulaire sodique entraînant ainsi une modification de l'influx de Ca via l'échange Na-Ca (Fozzard et al, 1985). On peut donc considérer que la participation sodique à la genèse de la contraction biphasique est négligeable.

Nos résultats ont montré que deux influx calciques semblent être impliqués dans la genèse de la contraction biphasique. Il apparaît important de préciser leur rôle respectif en étudiant la modification de l'amplitude de ces deux influx sous l'influence de variations de la concentration externe en Ca et en présence de divers agonistes et antagonistes des canaux calciques.



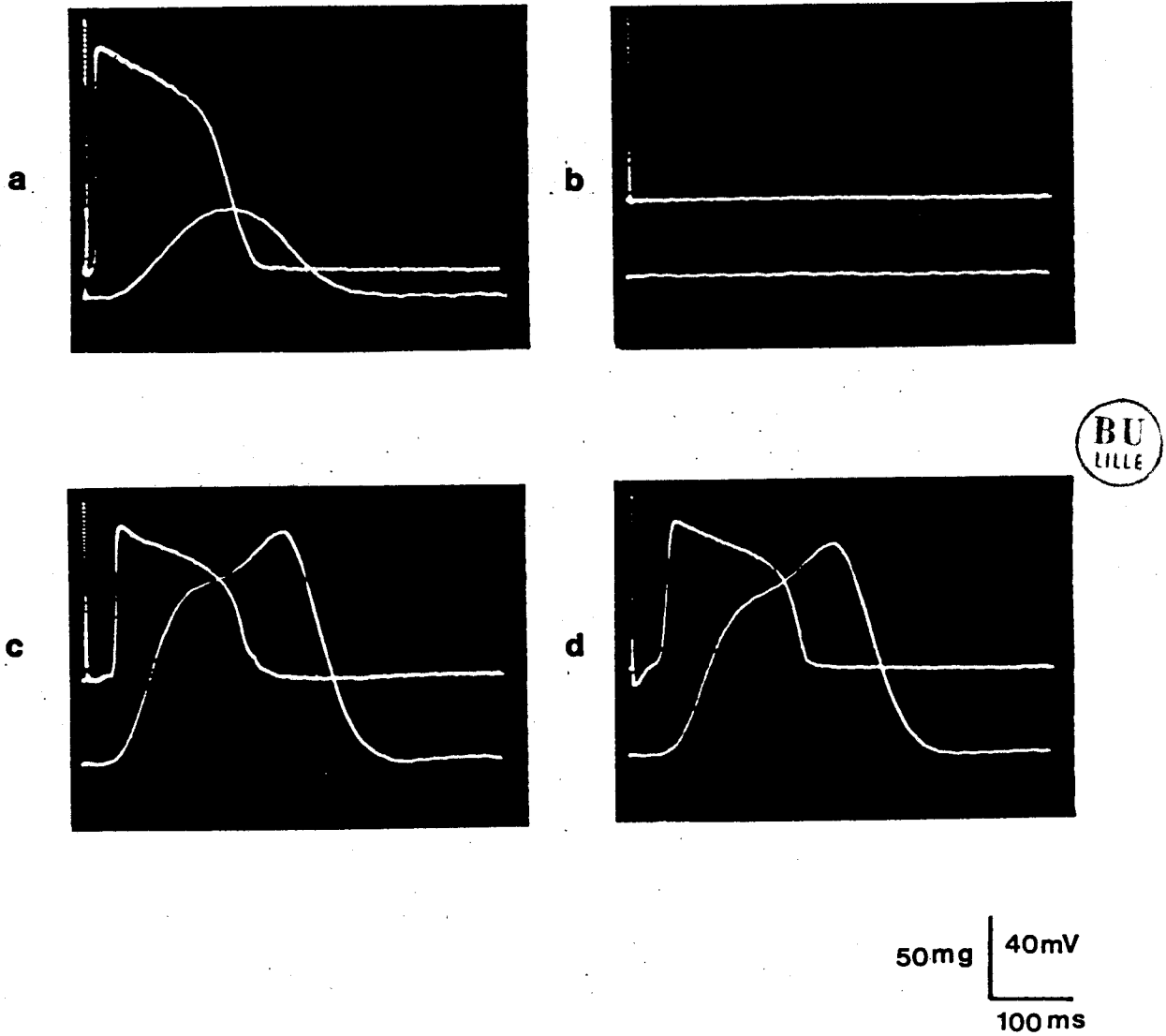


Fig 22 :

Effet de la TTX sur la contraction biphasique

a) Solution de tyrode

b) Solution hyperpotassique (17 mM)

c) Solution hyperpotassique additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

d) idem avec  $10^{-5}$  M de TTX

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

- Dépendance des deux composantes de contraction vis à vis du Ca extracellulaire (n = 7).

L'augmentation de la concentration externe en Ca entraîne une augmentation de l'inversion de potentiel, de la vitesse maximale de dépolarisation et une diminution de la durée du potentiel d'action (fig 23). L'inversion de potentiel augmente de façon linéaire avec le logarithme de la concentration externe en Ca (fig 24), la variation est de 31 mV par décade. La relation liant les modifications de la vitesse maximale de dépolarisation en fonction du logarithme de la concentration externe en Ca est aussi linéaire. Ces relations sont représentatives de la modification de l'intensité du courant de Ca en fonction du logarithme de la concentration extracellulaire. La durée du potentiel d'action mesurée à 50 % de la repolarisation diminue linéairement avec le logarithme de la concentration extracellulaire en Ca (fig 26). Cette diminution serait liée d'une part à l'augmentation d'un courant sortant transitoire activé par le Ca intracellulaire (Isenberg, 1977 ; Bassinghtwaighte et Reuter, 1972) et d'autre part à la diminution du gradient électrochimique aux ions Ca. La figure 27 représente la variation d'amplitude de la première composante en fonction du logarithme de la concentration extracellulaire en Ca. La relation est de type complexe alors que la relation liant l'amplitude de la seconde composante au logarithme de la concentration en Ca est linéaire (fig 28). Cette relation linéaire traduirait un rôle direct de l'influx calcique sur les protéines contractiles ; par contre un relai serait impliqué pour la première composante.

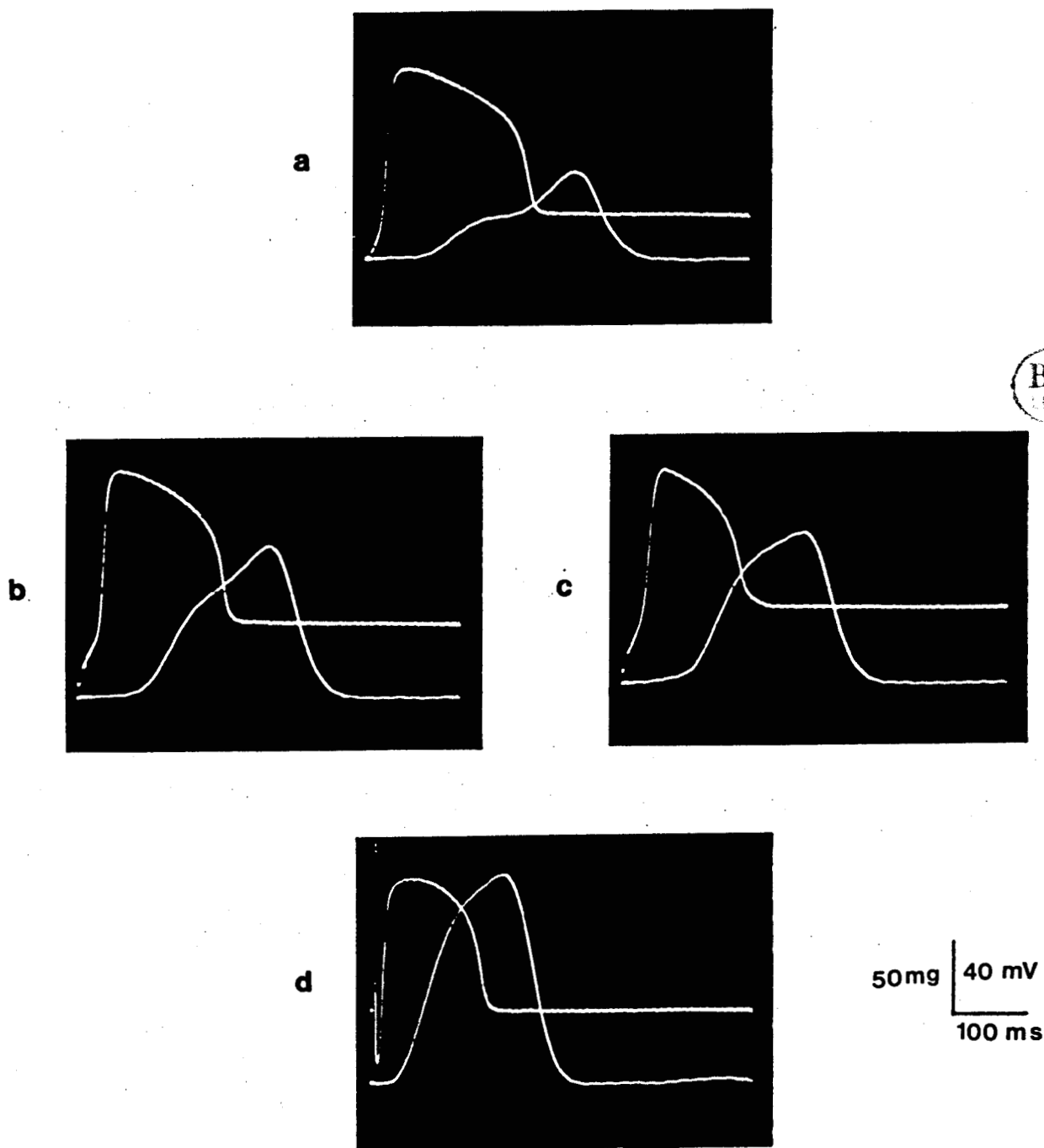


Fig 23 :

Effet du Ca sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) en présence de 0.9 mM de Ca

b) idem avec 1.8 mM de Ca

c) idem avec 3.6 mM de Ca

d) idem avec 7.2 mM de Ca

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

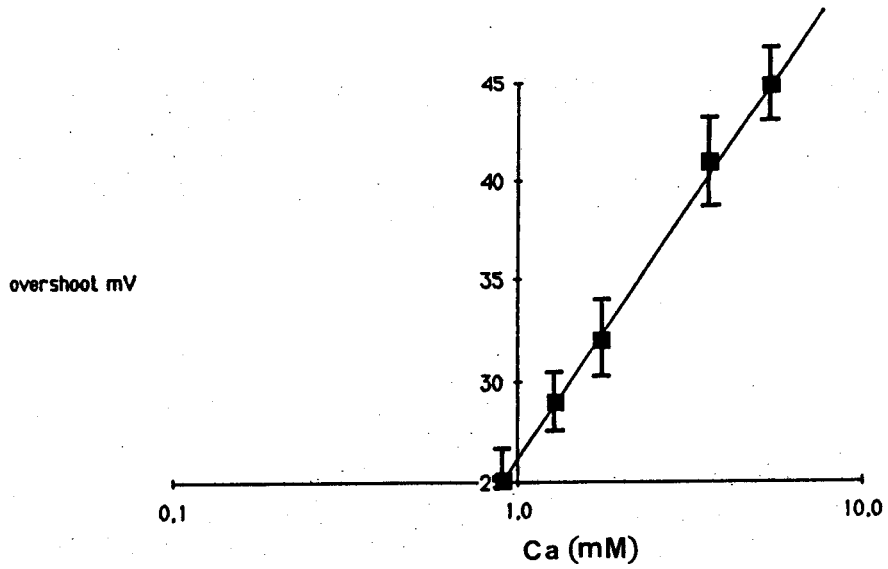


Fig 24 :



Evolution de l'amplitude de l'inversion de potentiel en fonction du log de la concentration externe en Ca.

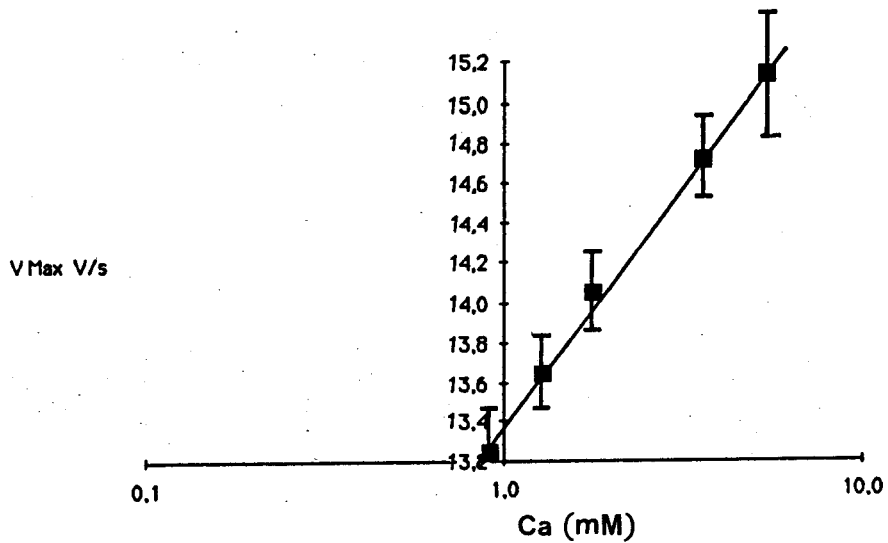


Fig 25 :

Evolution de la vitesse maximale de dépolarisation en fonction du log de la concentration externe en Ca.

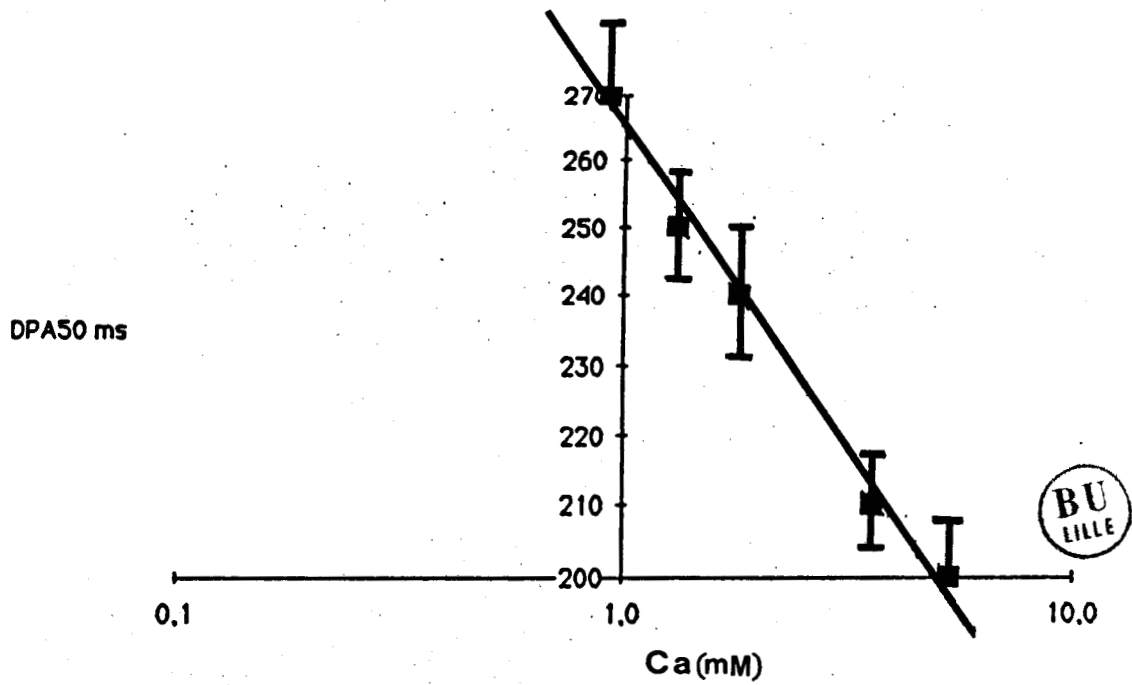


Fig 26 :

Evolution de la durée du potentiel d'action mesurée à 50 % de la repolarisation en fonction du log de la concentration externe en Ca.

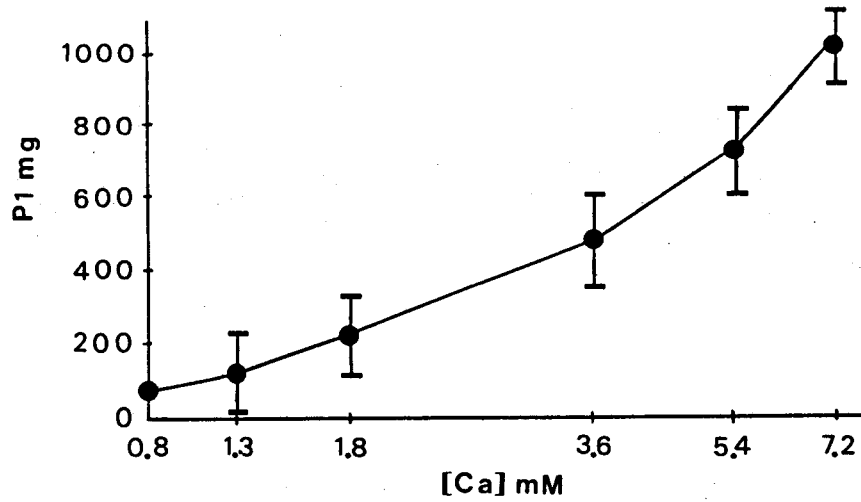


Fig 27 :

Evolution de l'amplitude de la première composante de contraction en fonction du log de la concentration externe en Ca.

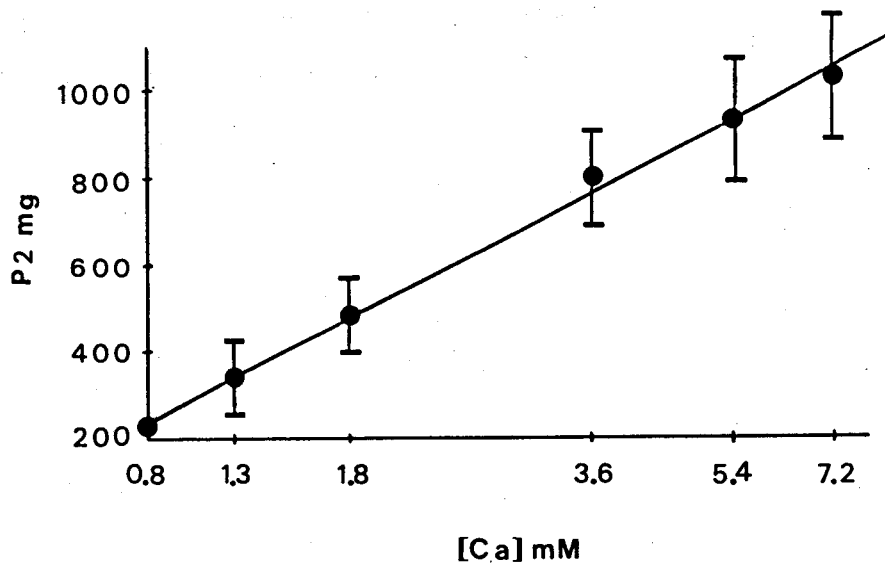


Fig 28 :

Evolution de l'amplitude de la seconde composante de contraction en fonction du log de la concentration externe en Ca.

- Effets des inhibiteurs calciques sur les deux composantes de contraction.

a) La manganèse (n = 5).

Sous l'effet du Mn le potentiel d'action devient triangulaire . Les figures 29 et 30 montrent que les ions Mn inhibent avec la même efficacité les deux composantes de contraction. L'effet est d'autant plus important que la concentration est plus élevée. Les deux composantes sont totalement abolies à la concentration de 1 mM de Mn. La concentration de  $2\ \mu\text{M}$  (fig. 30) entraîne une diminution de 50 % de chaque composante.

b) Le cadmium (n = 6).

Les figures 31 et 32 montrent que le Cd apparaît être un inhibiteur plus spécifique de la seconde composante de contraction. En effet, à la concentration de 0,1 mM, la contraction biphasique devient monophasique par suite de l'inhibition de la seconde composante de contraction. Comme le montre la figure 32 la DE50 est de  $1,5\ \mu\text{M}$ . L'amplitude et la durée du potentiel d'action sont plus fortement déprimées en présence de Mn qu'en présence de Cd.

c) La nifédipine (n = 5).

La nifédipine tout comme le Cd semble également bloquer plus spécifiquement la seconde composante de contraction correspondant au second courant entrant calcique (fig 33 et 34). Cependant cet effet de

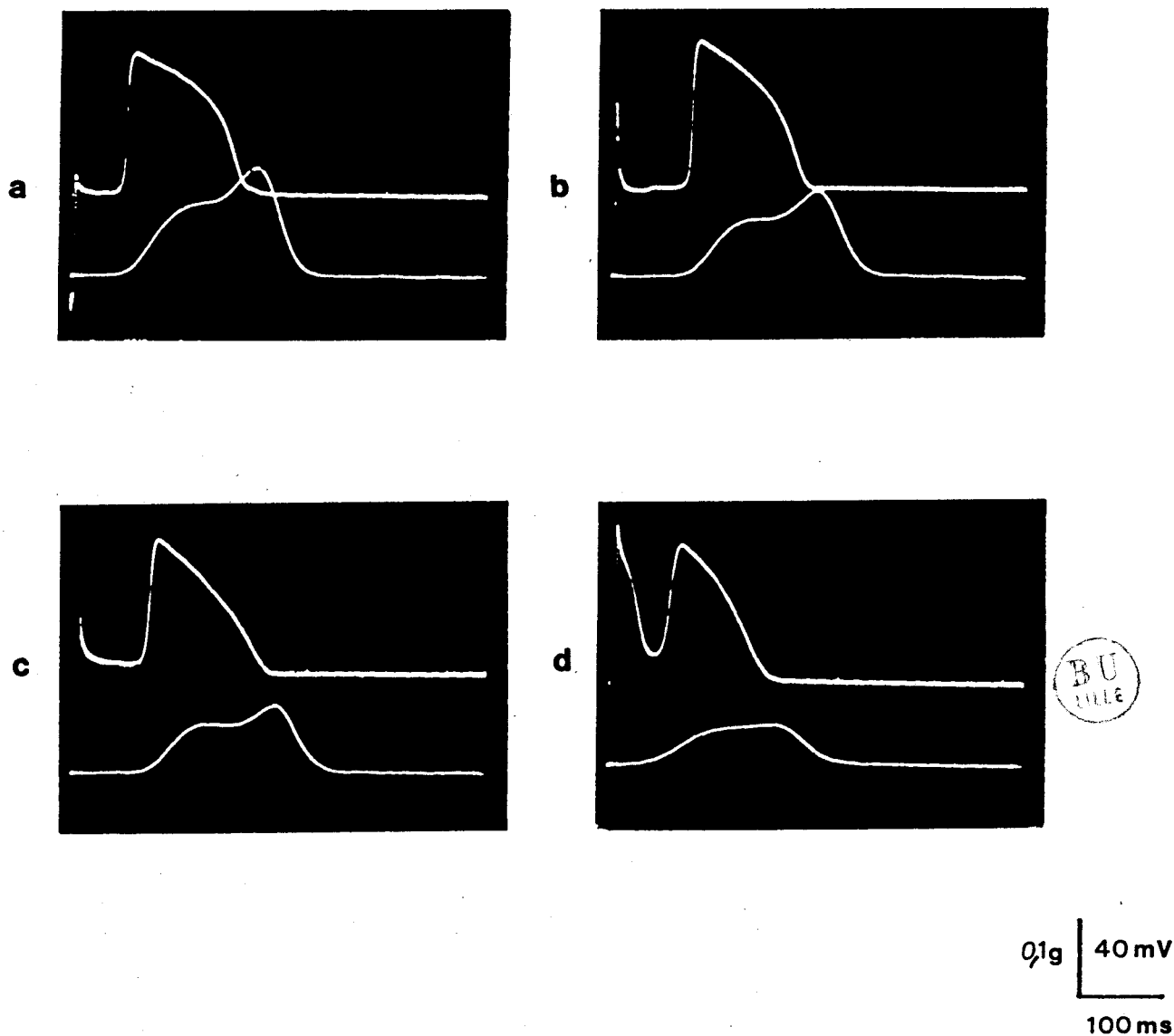


Fig 29 :

Effet du Mn sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

b) idem avec  $3 \cdot 10^{-7}$  M de Mn

c) idem avec  $3 \cdot 10^{-6}$  M de Mn

d) idem avec  $3 \cdot 10^{-5}$  M de Mn

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction



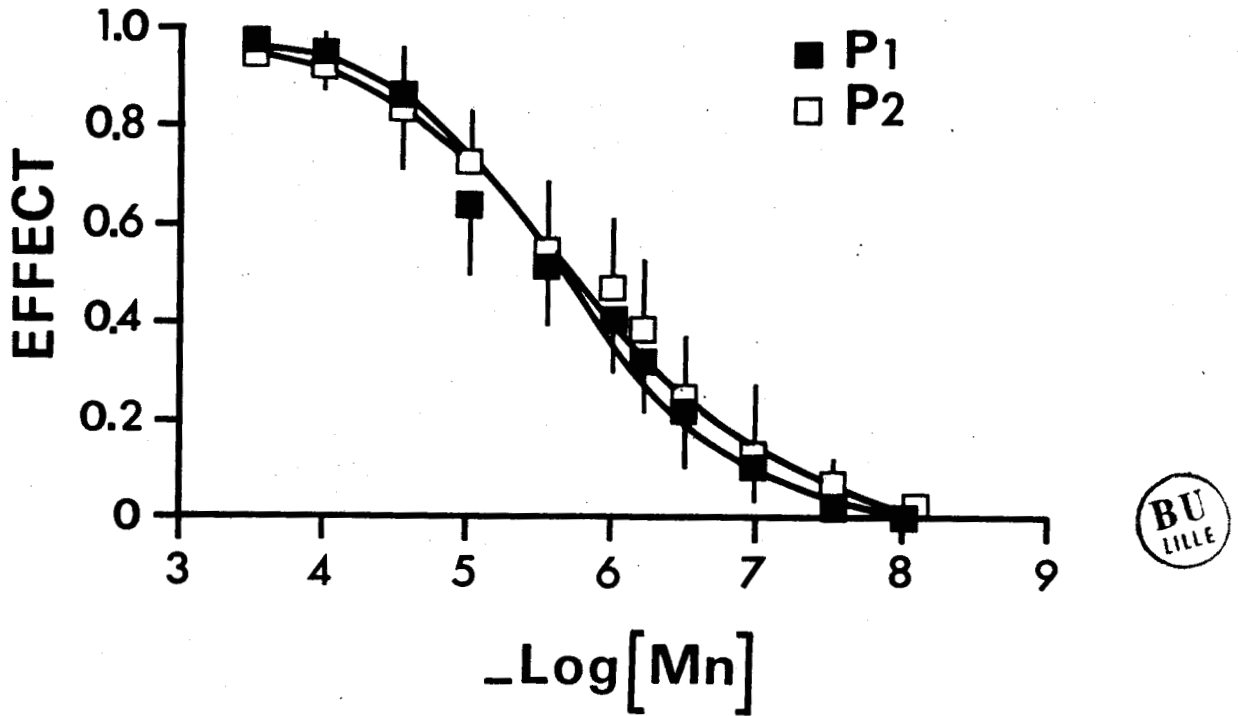


Fig 30 :

Evolution de l'amplitude des deux composantes de contraction en fonction du log de la concentration en Mn

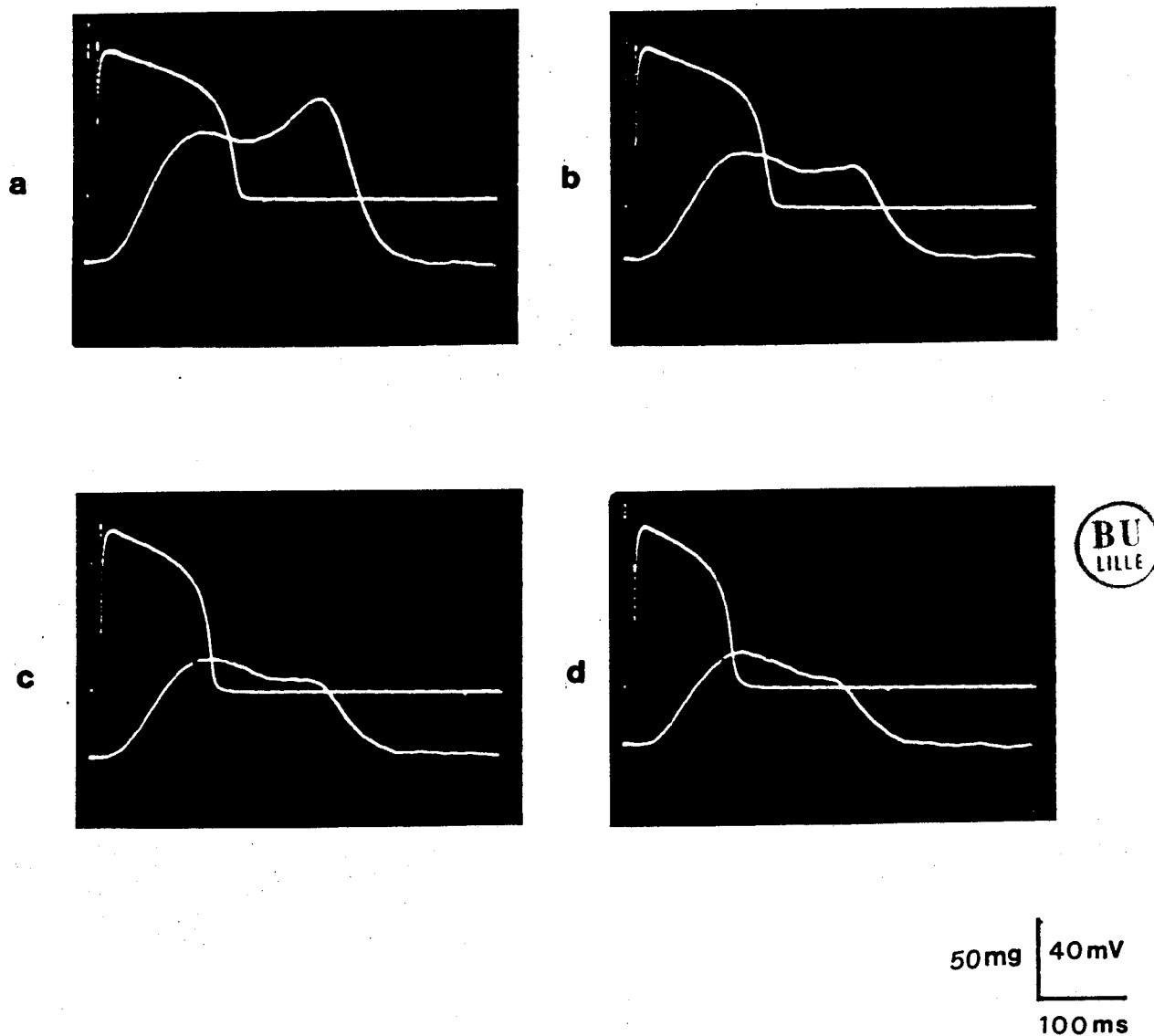


Fig 31 :

Effet du Cd sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

b) idem avec  $10^{-6}$  M de Cd

c) idem avec  $10^{-5}$  M de Cd

d) idem avec  $10^{-4}$  M de Cd

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

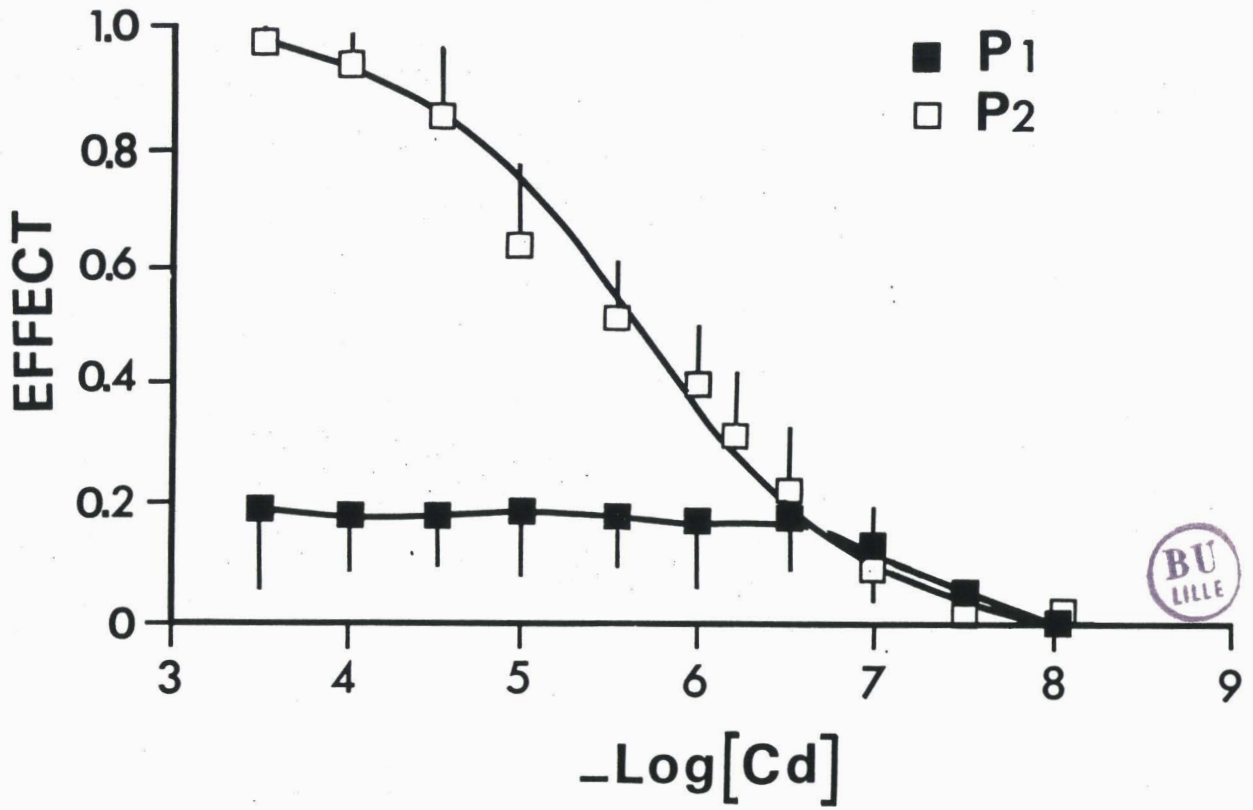


Fig 32 :

Evolution de l'amplitude des deux composantes de contraction en fonction du log de la concentration externe en Cd.

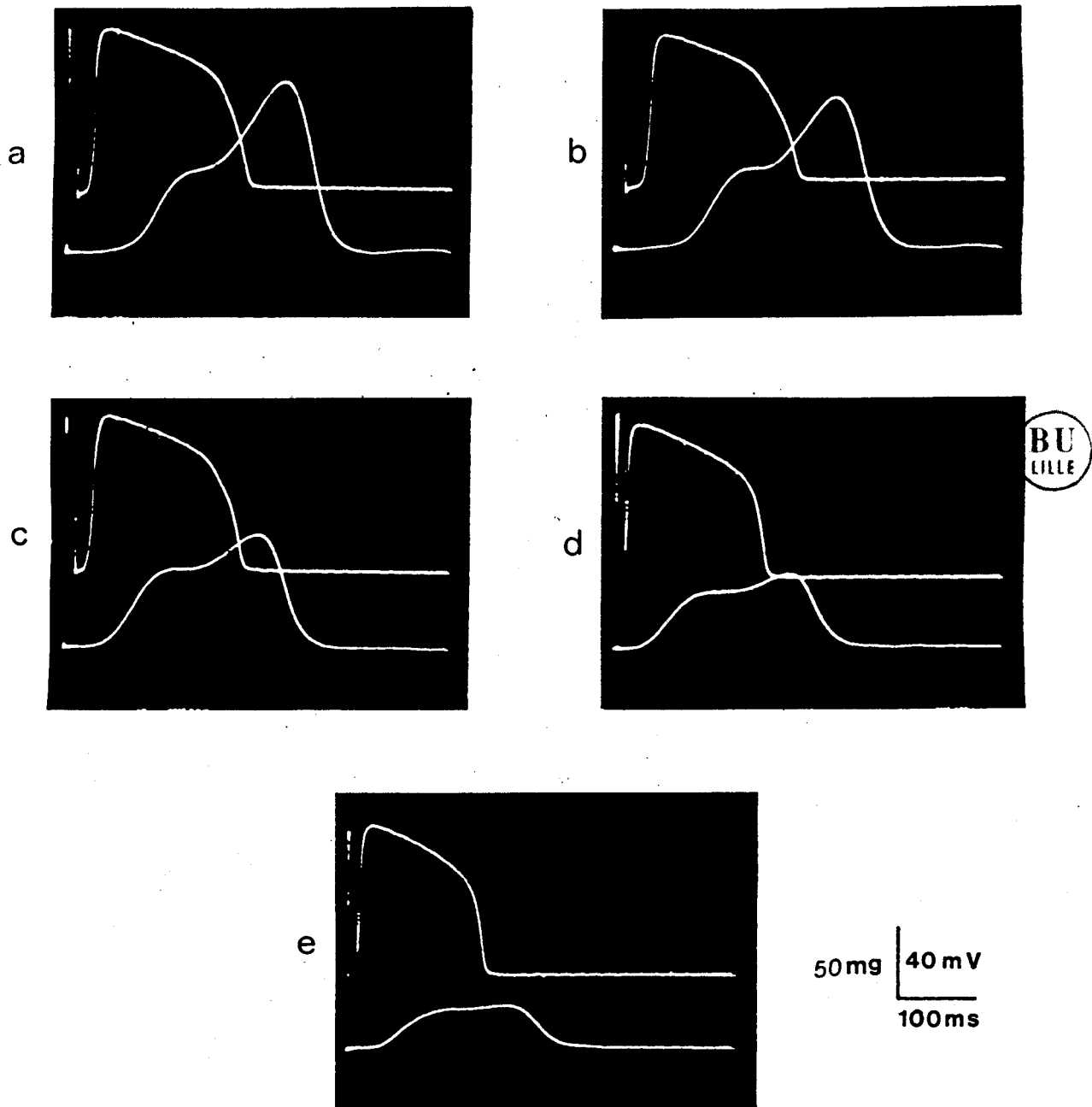


Fig 33 :

Effet de la nifédipine sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

b) idem avec  $3 \cdot 10^{-7}$  M de nifédipine

c) idem avec  $10^{-6}$  M de nifédipine

d) idem avec  $3 \cdot 10^{-6}$  M de nifédipine

e) idem avec  $10^{-5}$  M de nifédipine

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

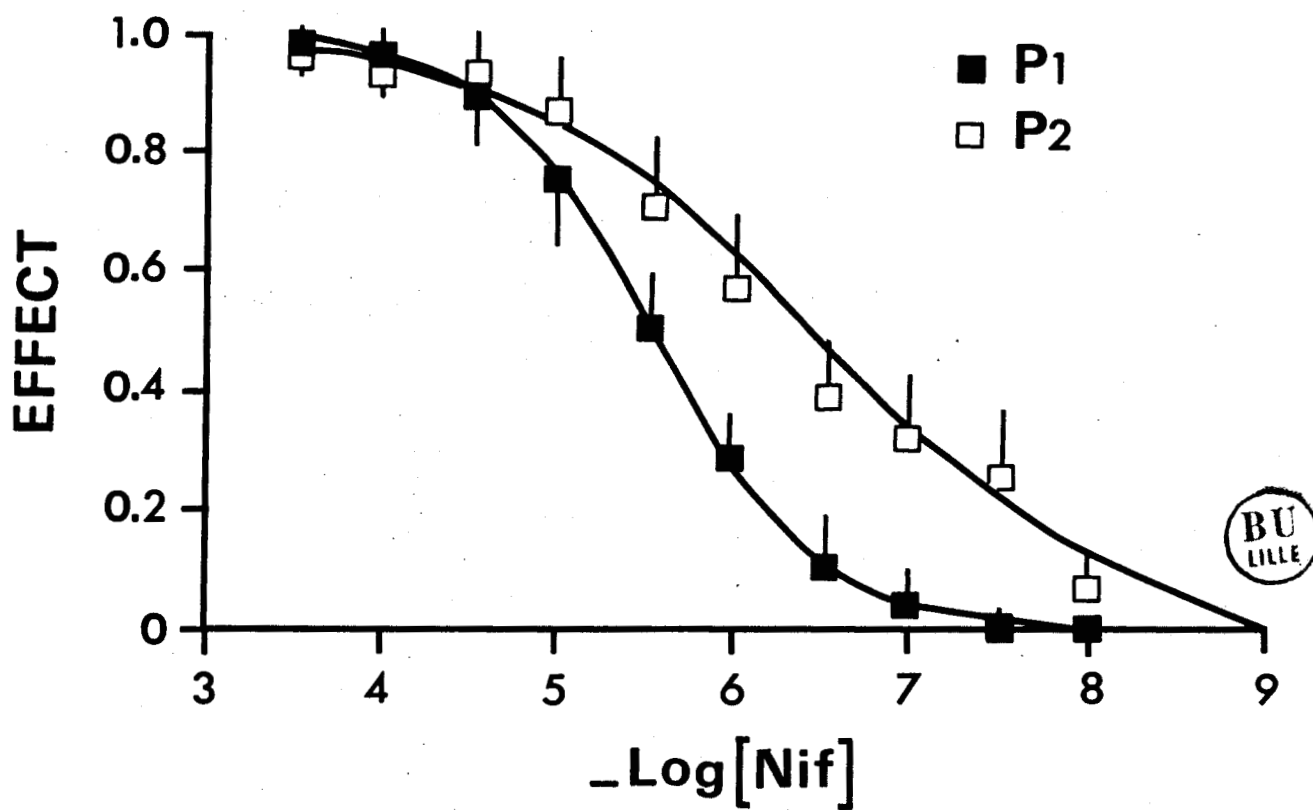


Fig 34 :

Evolution de l'amplitude des deux composantes de contraction en fonction du log de la concentration de nifédipine.

la nifédipine apparaît être moins spécifique que celui du Cd, puisque, aux plus fortes concentrations de nifédipine, la première composante est également supprimée. La dose efficace 50 est de  $3\ \mu\text{M}$  pour la première composante de contraction alors qu'elle n'est que de  $0,35\ \mu\text{M}$  pour la seconde.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec ceux de Bean (1985) et Nilius et al (1985) obtenus sur des cellules cardiaques isolées étudiées respectivement en "whole cell" et en "patch clamp". Ces auteurs concluent à un effet spécifique des dihydropyridines sur le courant entrant lent. L'amplitude et la durée du potentiel d'action en particulier DPA 50 sont moins affectées en présence de nifédipine qu'en présence de Mn.

Ces résultats concernant les effets des inhibiteurs de la perméabilité calcique confortent l'hypothèse selon laquelle deux types de canaux calciques existent dans la membrane de la cellule cardiaque. En effet, les deux composantes de contraction supposées correspondre chacune à un influx de Ca sont influencées différemment et spécifiquement selon l'inhibiteur calcique considéré. Pour étayer davantage l'hypothèse selon laquelle la contraction biphasique dépend bien de deux influx de Ca, il apparaît utile d'étudier aussi les effets de la substitution des ions Ca par d'autres ions divalents (Sr, Ba) sur la contraction biphasique. Ces ions divalents sont bien connus pour modifier la cinétique d'inactivation du courant entrant de Ca (Tillotson et Horn, 1978 ; Tillotson, 1979 ; Eckert et Shad, 1984 ; Ashcroft et Stanfield, 1982 ; Standen et Stanfield, 1982 ; Mitchell et al, 1983).

- Dépendance des deux composantes de contraction vis à vis des cations divalents.

a) Substitution du Ca extracellulaire par le Sr (n = 5).

Après l'inexcitabilité cellulaire obtenue par l'élévation de la concentration en K à 17 mM (fig 35), le Ca extracellulaire est totalement remplacé par du Sr (1,8 mM). Les ions Sr diminuant la conductance potassique, l'excitabilité cellulaire est restaurée et un potentiel d'action peut être déclenché sans addition d'isoprotérénol. La durée du potentiel d'action mesurée à 50 % de la repolarisation est de  $220 \pm 24$  ms pour une fréquence de stimulation de référence de 0,6 Hz. La contraction devient monophasique et seule la seconde composante, estimée par le temps au pic de contraction ( $259 \pm 37$  ms à la fréquence de référence de 0,6 Hz), est présente (fig 35a). Pour une fréquence de stimulation plus lente (0,1 Hz), l'évolution de la contraction au cours du temps suit celle du potentiel d'action (fig 35b). De plus si l'on exprime l'amplitude de la contraction normalisée en fonction du potentiel diastolique, on obtient une relation sigmoïde (figure 36) dont l'équation est identique à celle qui permet de décrire l'amplitude de la seconde composante de contraction en solution de référence. Un argument expérimental supplémentaire en faveur de l'absence de la première composante de contraction en présence de Sr est illustré dans la figure 37. Cette figure montre les effets du Cd associés à ceux du

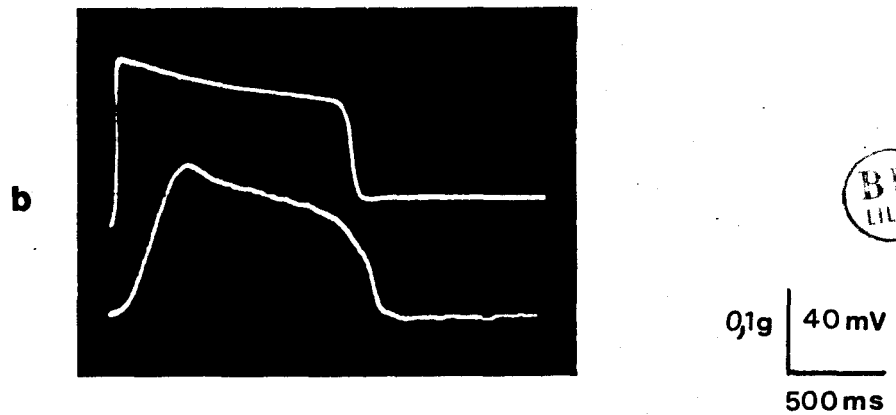
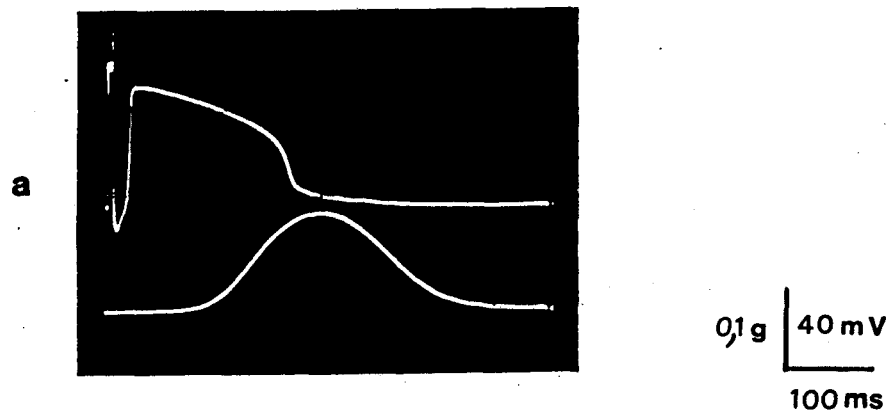


Fig 35 :

a) Décours du potentiel d'action et de la contraction en solution hyperpotassique (17 mM) en présence de 1.8 mM Sr et en absence de Ca. La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz.

b) idem mais la fréquence de stimulation est de 0.1 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

Notez la différence d'échelle de temps entre A et B.



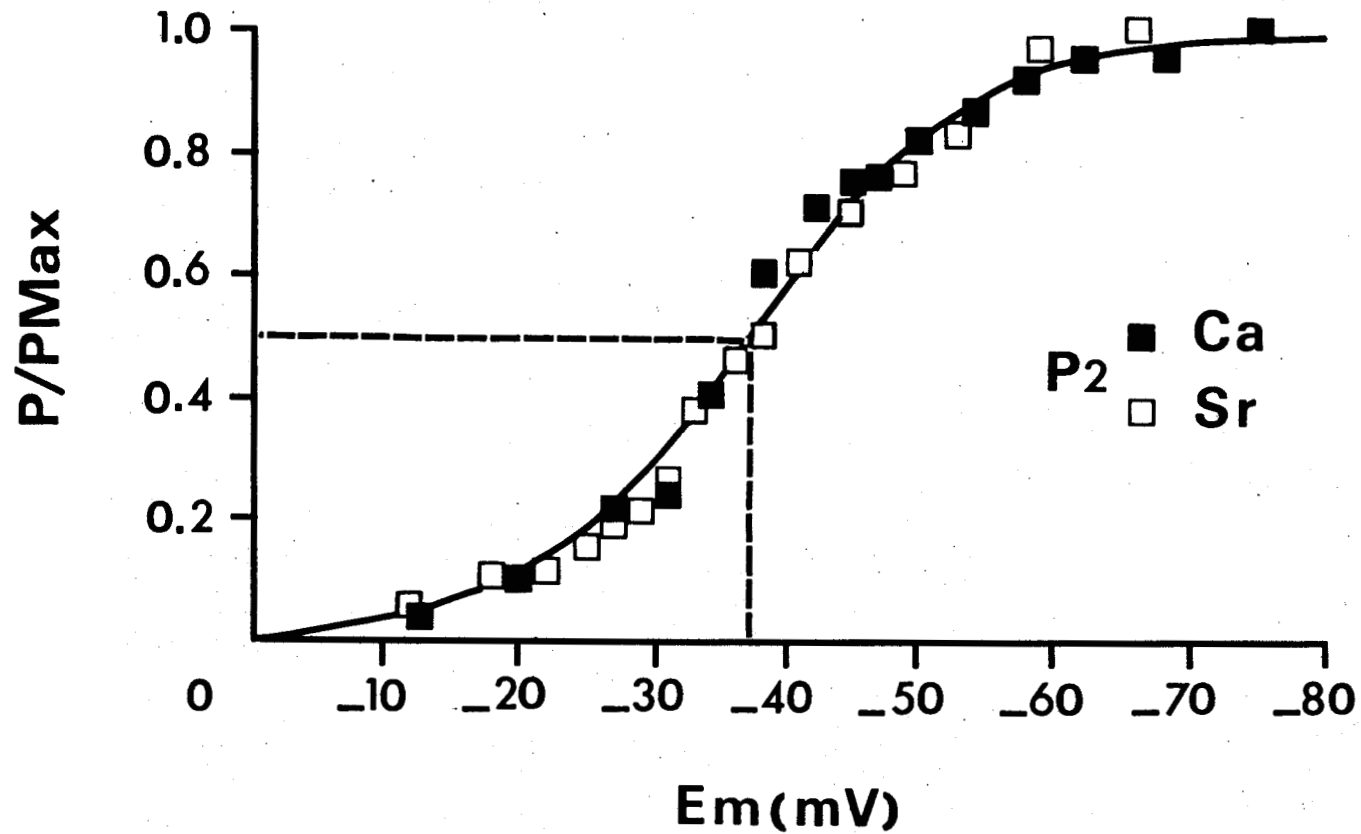


Fig 36 :

Evolution de l'amplitude normalisée de la seconde composante de contraction en présence de Sr en fonction du potentiel diastolique. La relation est décrite par l'équation  $P/P_{Max} = 1 / \{1 + e^{([E_m - E_k] / k)}\}$  avec  $E_k = -36$  mV,  $k = 8.2$ .



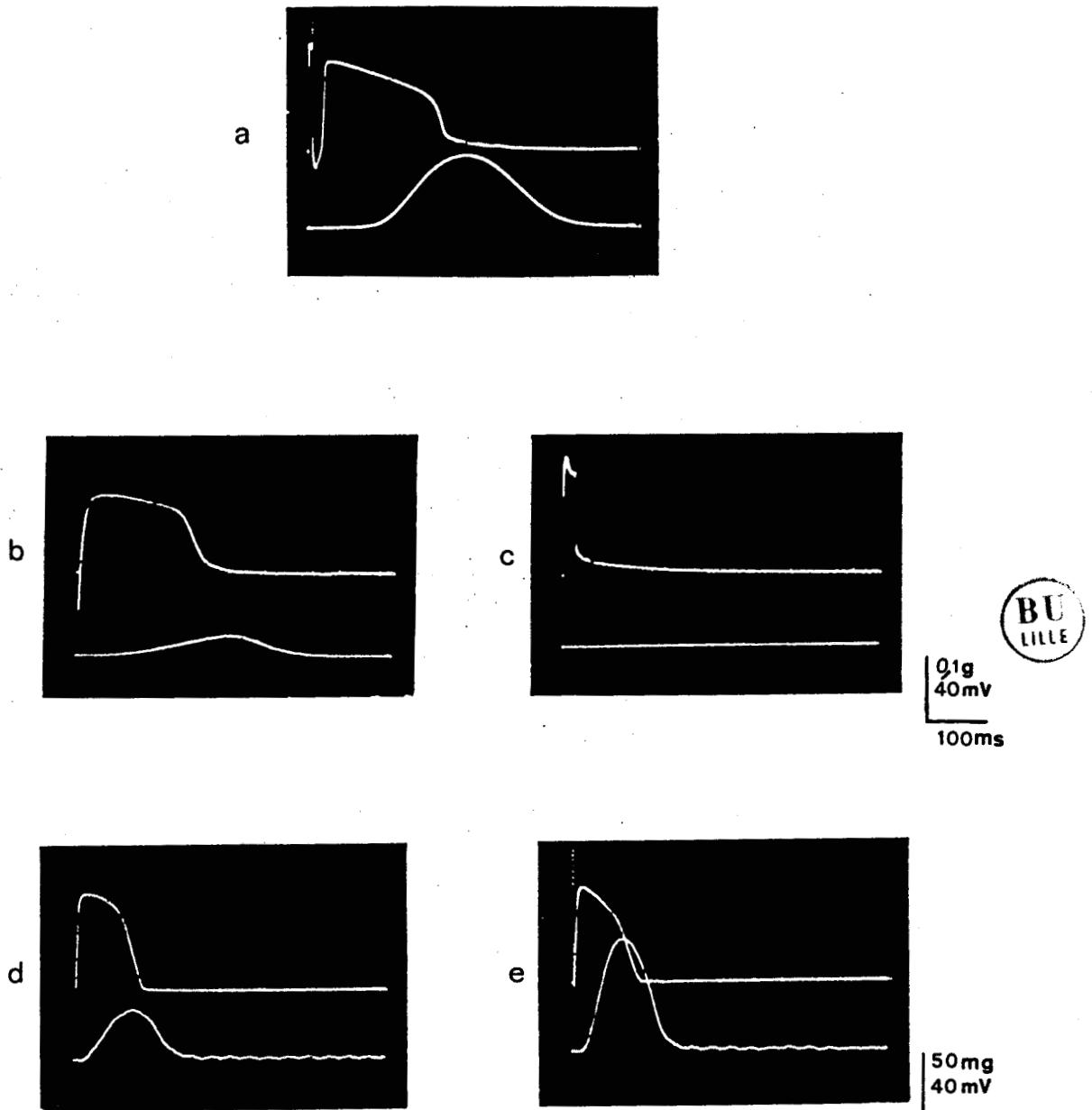


Fig 37 :

Effet du Cd sur la seconde composante de contraction obtenue en milieu hyperpotassique (17 mM) en présence de 1.8 mM de Sr et en absence de Ca.

a) Solution hyperpotassique (17 mM) en présence de 1.8 mM de Sr

b) idem avec 0.1 mM de Cd après 3 minutes

c) idem avec 0.1 mM de Cd après 7 minutes

d) idem avec 0.1 mM de Cd et 0.1 mM de Ca

e) idem avec 0.1 mM de Cd et 0.5 mM de Ca

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

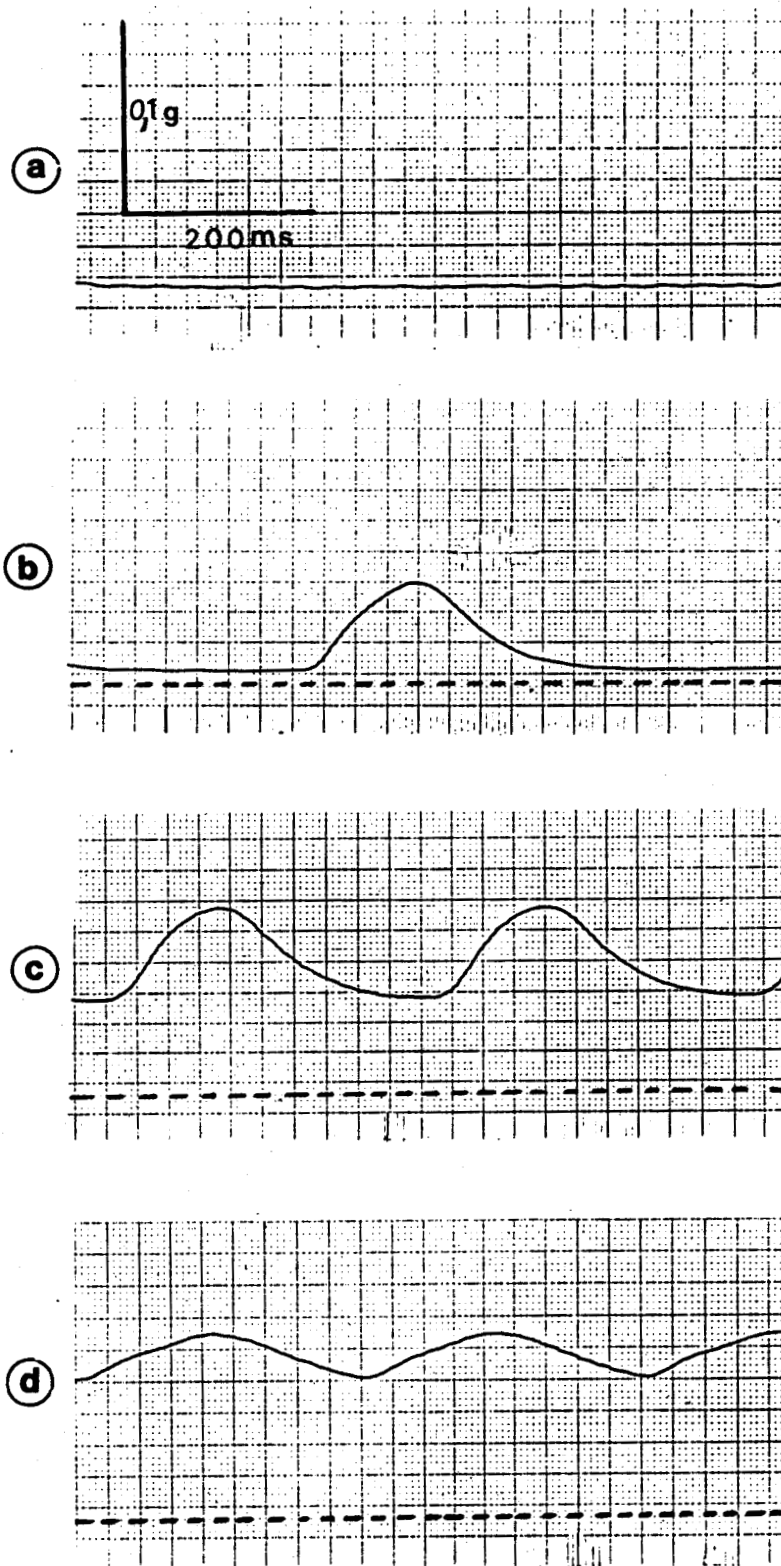
Tracé inférieur : contraction

Sr. Les tracés obtenus en présence de Sr montrent en particulier que le potentiel d'action n'est associé qu'à la seconde composante de contraction. Le Cd est ajouté au milieu dépourvu de Ca qui est remplacé par le Sr. Les tracés b et c de la figure 37 montrent qu'après 3 minutes de perfusion, la durée et l'amplitude du potentiel d'action ainsi que celle de la contraction diminuent. Après 7 minutes de perfusion les activités électrique et mécanique sont supprimées (fig 37c). Par contre, un faible apport de Ca extracellulaire (0.1 mM) en présence de Sr et de Cd permet la restauration rapide des activités électrique et mécanique qui correspondent à la première composante de contraction compte tenu du temps au pic de contraction, qui est dans ces conditions de  $91 \pm 14$  ms (fig 37d et 37e).

b) Substitution du Ca extracellulaire par le Ba (n = 3).

Après l'obtention de l'inexcitabilité cellulaire (K 17 mM) (fig 38a), le Ca extracellulaire est remplacé par du Ba (1.8 mM). Dans ces conditions, comme le montre la figure 38b, l'excitabilité cellulaire est restaurée sans addition d'isoprotérénol. Après 5 minutes de perfusion, une contracture se développe et un automatisme apparaît (fig 38c et d). La contracture serait provoquée selon Potreau et Raymond (1985) par l'incapacité du Ba à remplacer le Ca dans le mécanisme d'échange Na-Ca.

Il apparaît qu'en présence de Sr, la première composante de contraction est inhibée. Ce résultat est pleinement en accord avec les travaux de King et Bose (1983). Ces auteurs montrent qu'en présence de Sr, seule est présente la seconde composante de contraction et que la



BU  
LILLE

Fig 38 :

Effet d'une substitution du Ca par le Ba sur l'activité contractile  
 a) Solution hyperpotassique (17 mM)  
 b) Solution hyperpotassique (17 mM) en présence de 1.8 mM de Ba et en absence de Ca après 4 minutes  
 c) idem après 6 minutes ; un automatisme et une contracture se développent.  
 d) idem après 9 minutes ; un automatisme et une contracture se développent.  
 La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

première composante de contraction est restaurée en présence d'une faible quantité de Ca (0.1 mM).

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus permettent de supposer que l'influx de Ca à l'origine de la première composante de contraction obtenue dans les conditions de référence, ne peut être remplacé par un influx correspondant de Sr ou que le Sr ne peut se substituer au Ca dans les processus intracellulaires impliqués dans le déclenchement de la première composante de contraction.

L'amplitude de la seconde composante de contraction est liée linéairement avec le logarithme de la concentration extracellulaire de Ca. Ceci peut correspondre à un effet direct des ions Ca entrant dans la cellule sur les protéines contractiles. Par contre, en ce qui concerne la première composante de contraction, son amplitude ne varie pas linéairement avec le logarithme de la concentration externe en Ca. Il semble indispensable d'impliquer une étape supplémentaire c'est-à-dire un relai intracellulaire pouvant être le RS. Ces données tendent donc à conforter l'hypothèse selon laquelle la première composante de contraction serait liée à une libération de Ca par le RS selon le mécanisme de Ca-induced Ca release (Fabiato 1985), mécanisme qui serait déclenché par l'influx de Ca s'écoulant à travers des canaux calciques rapides.

Ces interprétations sont renforcées par deux types d'expériences décrites ci-après : 1) l'effet de variations de la fréquence de stimulation dont on connaît le retentissement sur le stockage et la libération de Ca par le RS ; 2) l'effet de substances pharmacologiques connues pour modifier la translocation du Ca au niveau du RS (caféine et procaine).

- Effets de la fréquence de stimulation sur la contraction biphasique (n = 8).

Après une période de quiescence de 15 minutes ("rested-state contraction"), la contraction est monophasique (fig 39a) : la première composante est absente et la seconde présente une amplitude importante. A la fréquence de stimulation de référence (0.6 Hz), les deux composantes de contraction sont présentes et facilement discernables (fig 39b), la première composante ayant une amplitude inférieure à celle de la seconde. Pour une fréquence de stimulation plus élevée (1 Hz), l'amplitude de la première composante augmente et la seconde composante semble disparaître (fig 39c et 40). Il a été montré précédemment que l'inversion de potentiel et la durée du potentiel d'action varient linéairement avec le logarithme de la concentration extracellulaire en Ca. Il est donc apparu intéressant de corrélérer également l'amplitude des 2 composantes de contraction à ces 2 paramètres électriques qui sont représentatifs de l'intensité du courant calcique.

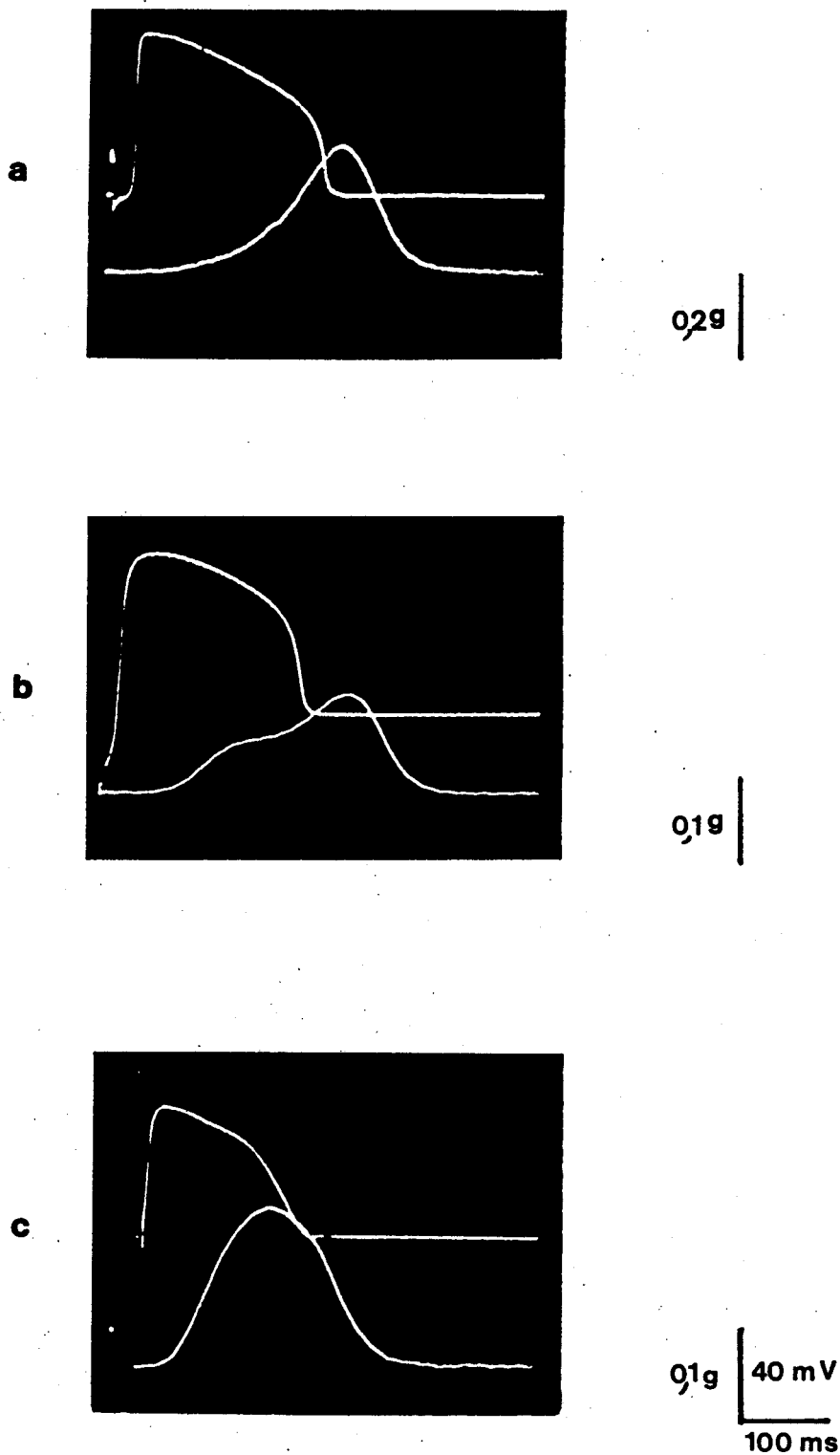


Fig 39 :

Effet de la fréquence de stimulation sur la contraction biphasique  
 a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)  
 ; première contraction après 15 minutes de quiescence.  
 b) idem ; la fréquence de stimulation est de 0.6 Hz  
 c) idem ; la fréquence de stimulation est de 1 Hz  
 Tracé supérieur : potentiel d'action  
 Tracé inférieur : contraction

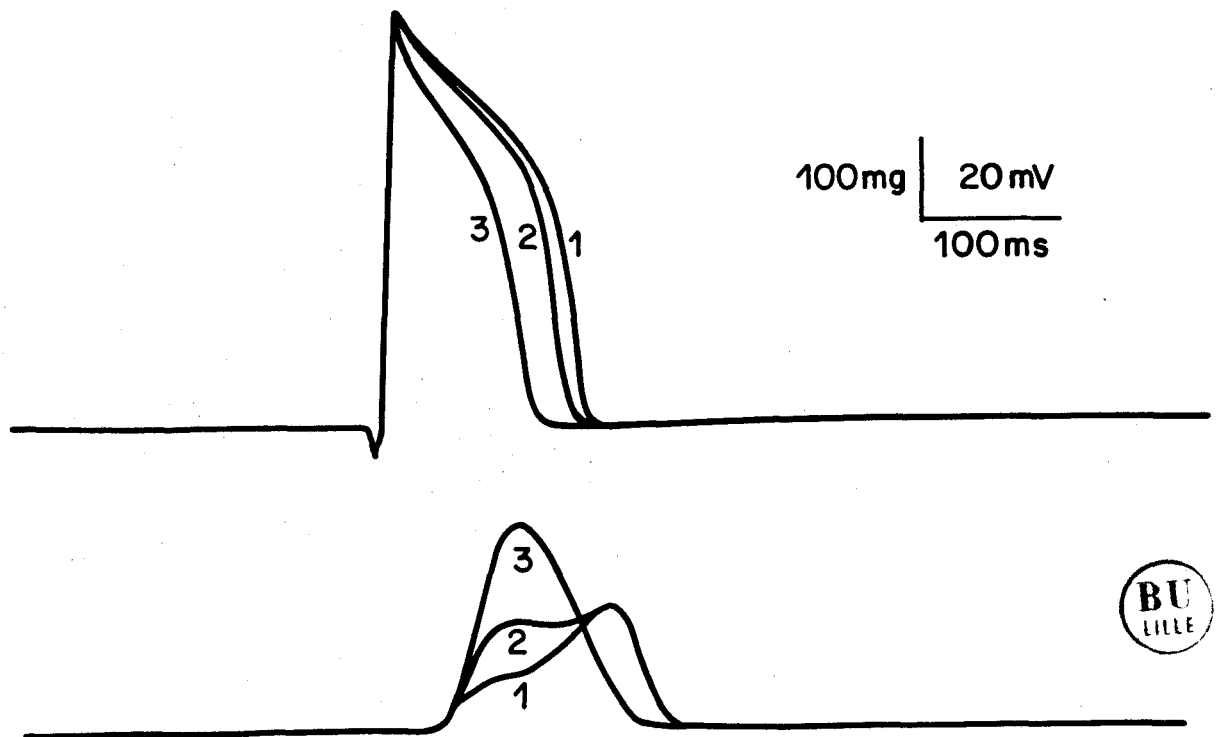


Fig 40 :

Effet de la fréquence de stimulation sur la contraction biphasique

1) Solution hyperpotassique (22 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M) ;  
la fréquence de stimulation est de 0.2 Hz

2) idem ; la fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

3) idem ; la fréquence de stimulation est de 1.5 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction



Ainsi les relations liant l'amplitude de la seconde composante à ces deux paramètres électriques sont linéaires (fig 42 et 44). Par contre, les relations liant l'amplitude de la première composante à l'amplitude de l'inversion de potentiel et à la durée du potentiel d'action mesurée à 50 % de la repolarisation sont complexes (fig 41 et 43). De ce fait, il semble qu'un relai soit nécessaire pour expliquer la genèse de la première composante de contraction. Le RS apparaît être un maillon important dans le développement de la première composante de contraction : en effet, après une période de quiescence de 15 minutes, la contraction est monophasique. On sait que pendant la quiescence, le RS se vide de son calcium (Allen, 1976 ; Koch-Weser, 1963) alors qu'à l'inverse, lors d'une activité itérative, il se charge en Ca. Cette charge en Ca se traduirait par le développement de la première composante qui résulterait d'une libération de Ca au niveau du RS déclenchée par l'influx calcique rapide selon le mécanisme de Ca-induced Ca release (Fabiato 1985).

L'étude des effets de substances pharmacologiques, la caféine et la procaine, bien connues pour provoquer respectivement la libération du Ca intraréticulaire et son blocage pourrait confirmer cette hypothèse.

- Effets de la caféine et de la procaine sur les deux composantes de contraction.

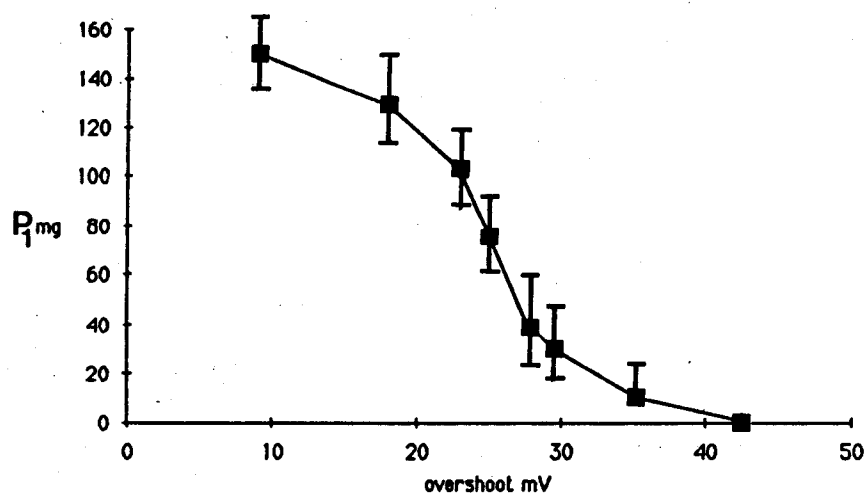


Fig 41 :



Evolution de l'amplitude de la première composante de contraction en fonction de l'amplitude de l'inversion de potentiel

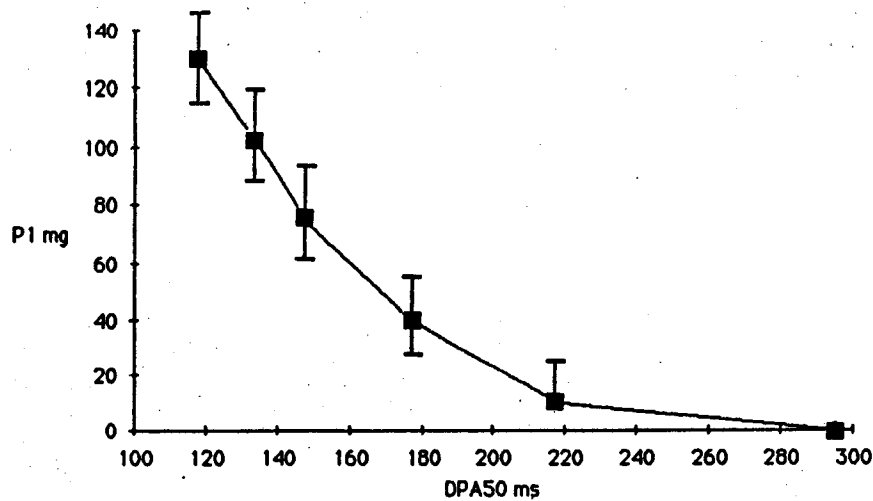


Fig 43 :

Evolution de l'amplitude de la première composante de contraction en fonction de la durée du potentiel d'action mesurée à 50 % de la repolarisation.

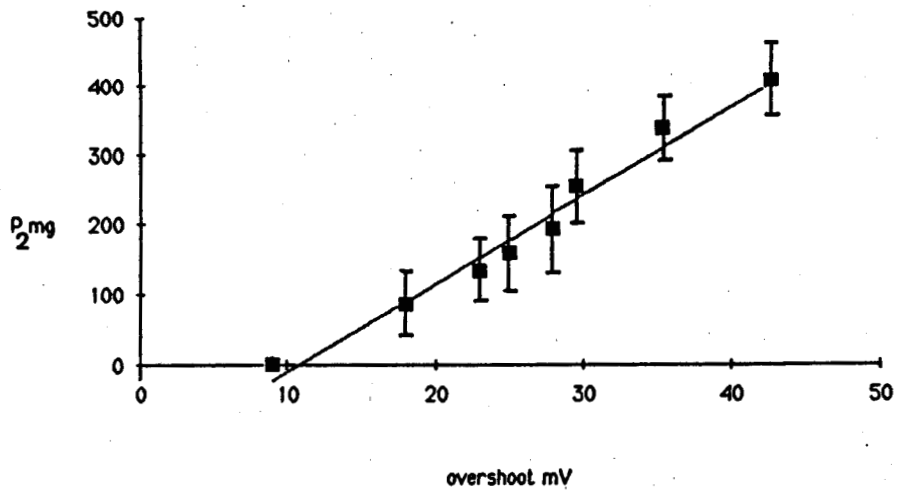


Fig 42 :

Evolution de l'amplitude de la seconde composante de contraction en fonction de l'amplitude de l'inversion de potentiel

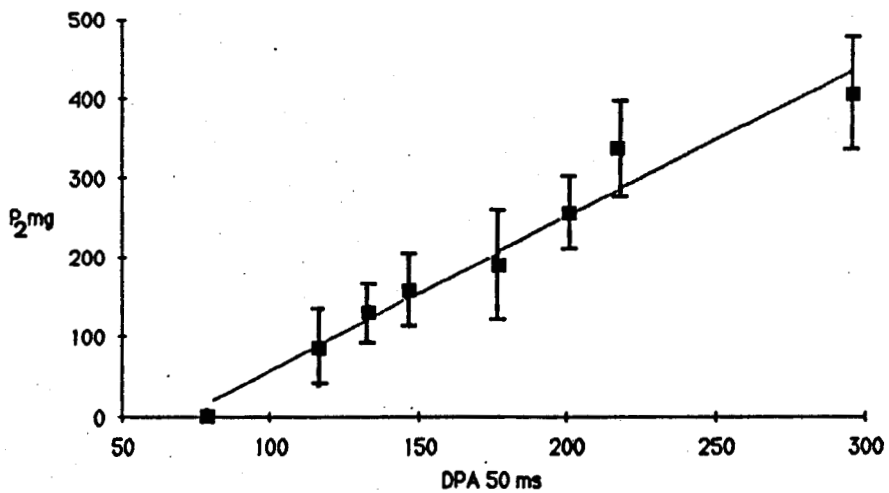


Fig 44 :

Evolution de l'amplitude de la seconde composante de contraction en fonction de la durée du potentiel d'action mesurée à 50 % de la repolarisation.

composante est totalement inhibée à la concentration de 1 mM (fig 45 et fig 46). La seconde composante de contraction est augmentée par la caféine à partir de la concentration de 1  $\mu$ M. Lorsque des post-contractions associées à des post-potentiels sont présents, ils sont supprimés pour des concentrations de caféine supérieures à 0.1 mM (fig 45).

b) Dépendance de la seconde composante vis-à-vis du potentiel membranaire en présence de caféine (n = 4).

En présence de 1 mM de caféine, concentration pour laquelle la première composante de contraction est inhibée, l'effet du potentiel de membrane sur l'amplitude de la seconde composante de contraction est analysée. La figure 47 montre que la diminution du potentiel de membrane obtenue par élévation de la concentration en K extracellulaire se traduit par une diminution de l'amplitude de la seconde composante de contraction. La relation liant l'amplitude de la contraction normalisée au potentiel de membrane (fig 48) se traduit comme en l'absence de caféine (solution de référence), par une relation sigmoïde. Ce dernier résultat mérite d'être souligné car il montre en effet qu'il ne semble pas exister de chevauchement important entre les deux composantes de contraction dans les conditions de référence. L'estimation quantitative de l'amplitude des 2 composantes peut donc être prise en compte. Par ailleurs, puisque la relation liant l'amplitude de la seconde composante de contraction au potentiel de membrane traduit la disponibilité de la conductance calcique lente en fonction du potentiel de membrane, ces résultats montrent que la caféine est sans effet sur l'inactivation du canal calcique lent.

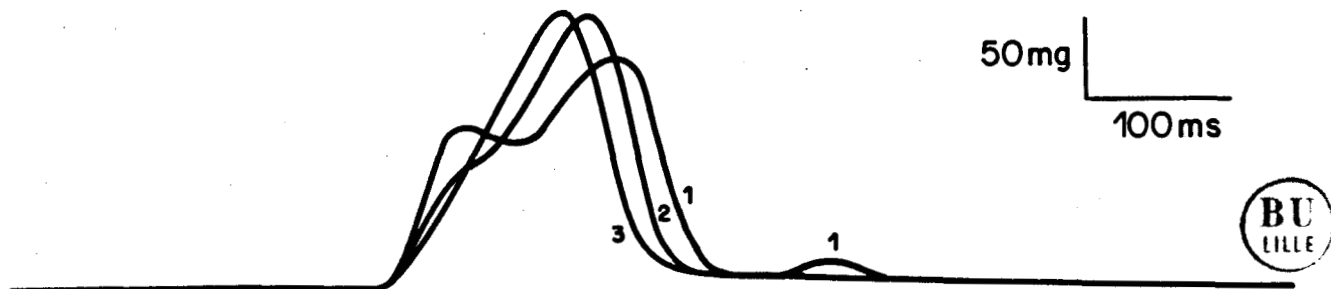


Fig 45 :

Effet de la caféine sur la contraction biphasique

1) Solution hyperpotassique (22 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M)

2) idem avec 1 mM de caféine après 2 minutes

3) idem avec 1 mM de caféine après 4 minutes

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

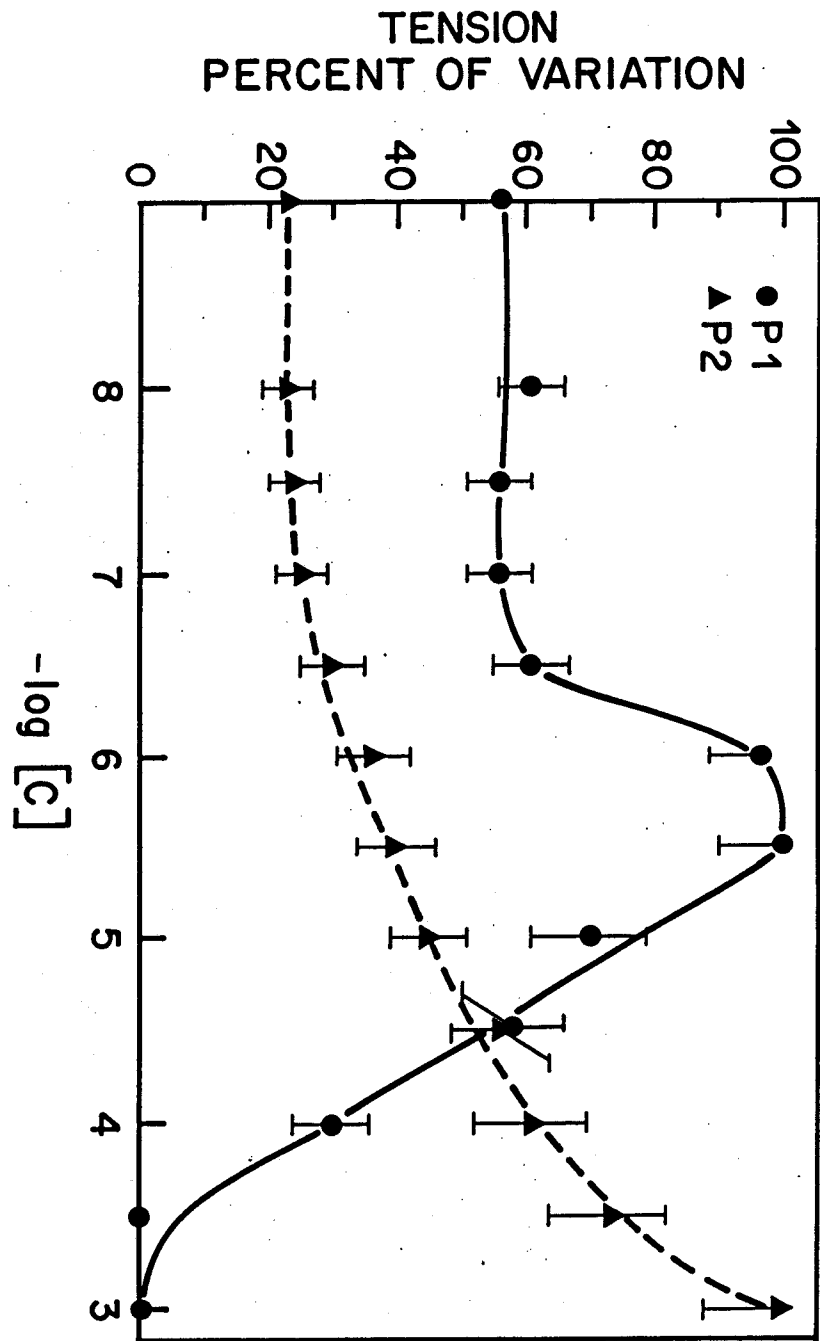


Fig 46 :

Evolution de l'amplitude des deux composantes de contraction en fonction du logarithme de la concentration de caféine.

P1 : première composante de contraction

P2 : seconde composante de contraction

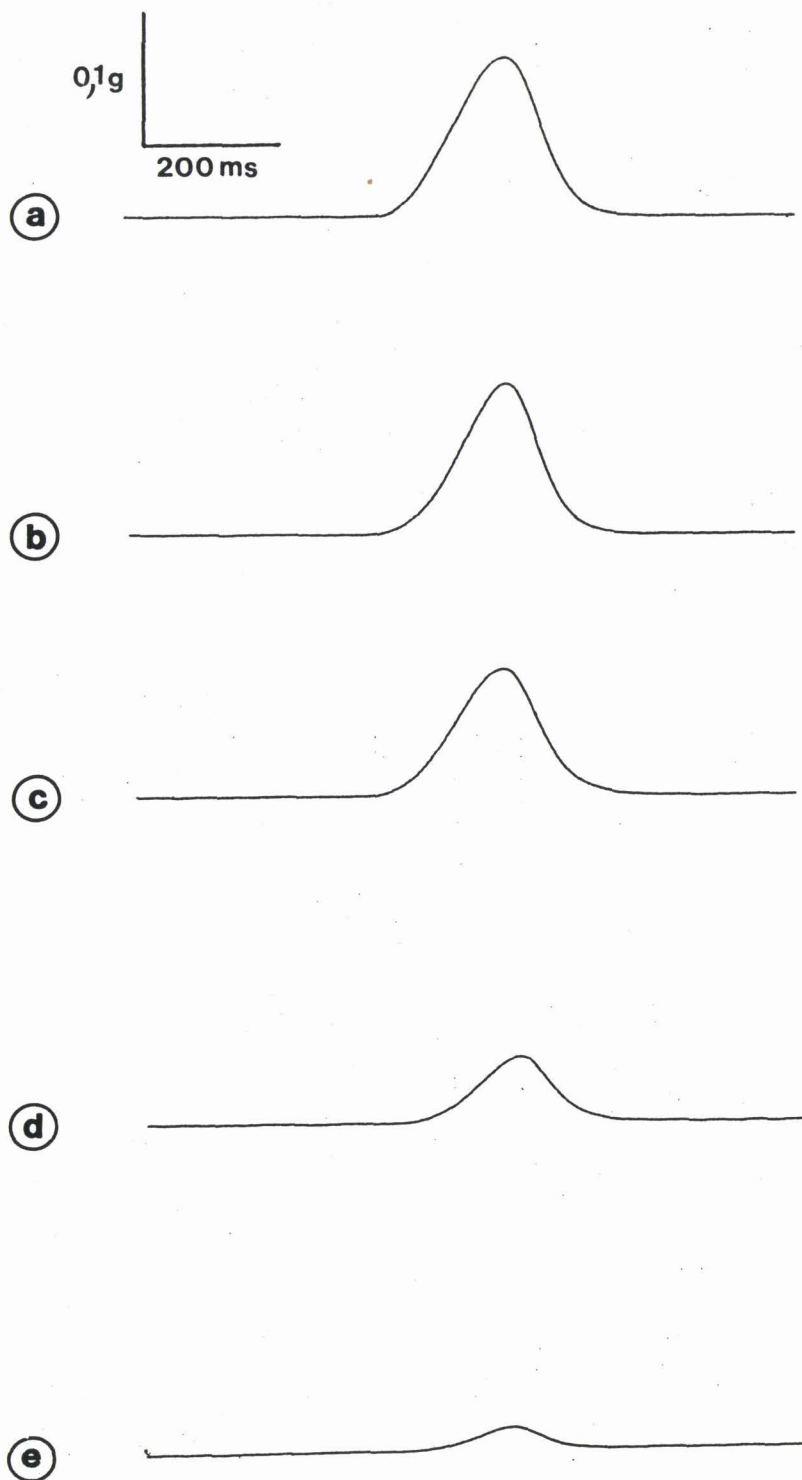


Fig 47 :

Effet du potentiel de membrane sur l'amplitude de la seconde composante de contraction obtenue en milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) et en présence de 1 mM de caféine.

- a) K : 6 mM
- b) K : 12 mM
- c) K : 18 mM
- d) K : 30 mM
- e) K : 35 mM

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

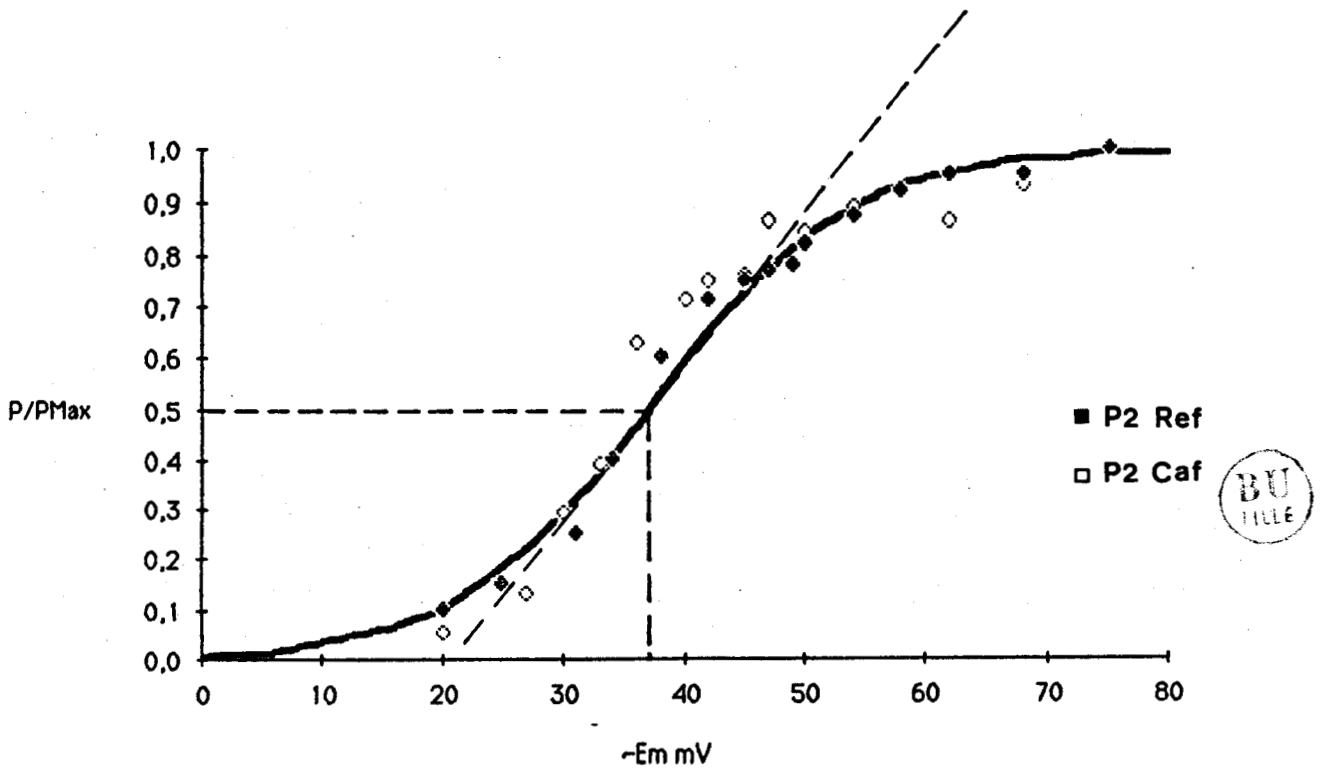


Fig 48 :

Evolution de l'amplitude normalisée de la seconde composante de contraction obtenue en solution hyperpotassique additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) et en présence de 1 mM de caféine en fonction du potentiel diastolique.

La relation est décrite par l'équation  $P/P_{Max} = 1 / \{1 + e^{([E_m - E_k]/k)}\}$  avec  $E_k = -36$  mV,  $k = 8.2$ .



c) Effets de la procaïne (n = 7).

La procaïne exerce, à toutes les concentrations utilisées, un effet inhibiteur sur la première composante de contraction (fig 50). Cette dernière est inhibée totalement pour des concentrations supérieures à 3 mM. Par contre, l'effet de la procaïne sur l'amplitude de la seconde composante dépend de la concentration utilisée. Aux faibles concentrations ( $3 \cdot 10^{-8}$  M et  $10^{-6}$  M), elle augmente en moyenne de 10 % l'amplitude de cette seconde composante alors qu'aux fortes concentrations, elle la diminue. La figure 49 résume les effets de la procaïne aux concentrations de  $1 \mu\text{M}$  et de 1mM sur la contraction obtenue en milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol. Il faut remarquer que pour  $1 \mu\text{M}$  de procaïne, la seconde composante augmente alors que la première diminue ; cette augmentation de l'amplitude serait due à l'augmentation concomitante de la durée du potentiel d'action (non illustré). Pour une concentration de 1 mM, la première composante de contraction disparaît et l'amplitude de la seconde composante diminue fortement.

d) Effets de la procaïne en présence de caféine (n=7).

En présence de 1 mM de caféine (qui inhibe la première composante), la procaïne exerce les mêmes effets sur la seconde composante de contraction qu'en solution de référence (fig 51 et 52) : une augmentation de l'amplitude de la seconde composante de contraction aux faibles concentrations (fig 52) et une diminution aux fortes concentrations. Cet effet biphasique en fonction de la concentration de procaïne est illustré sur les tracés de la figure 51.

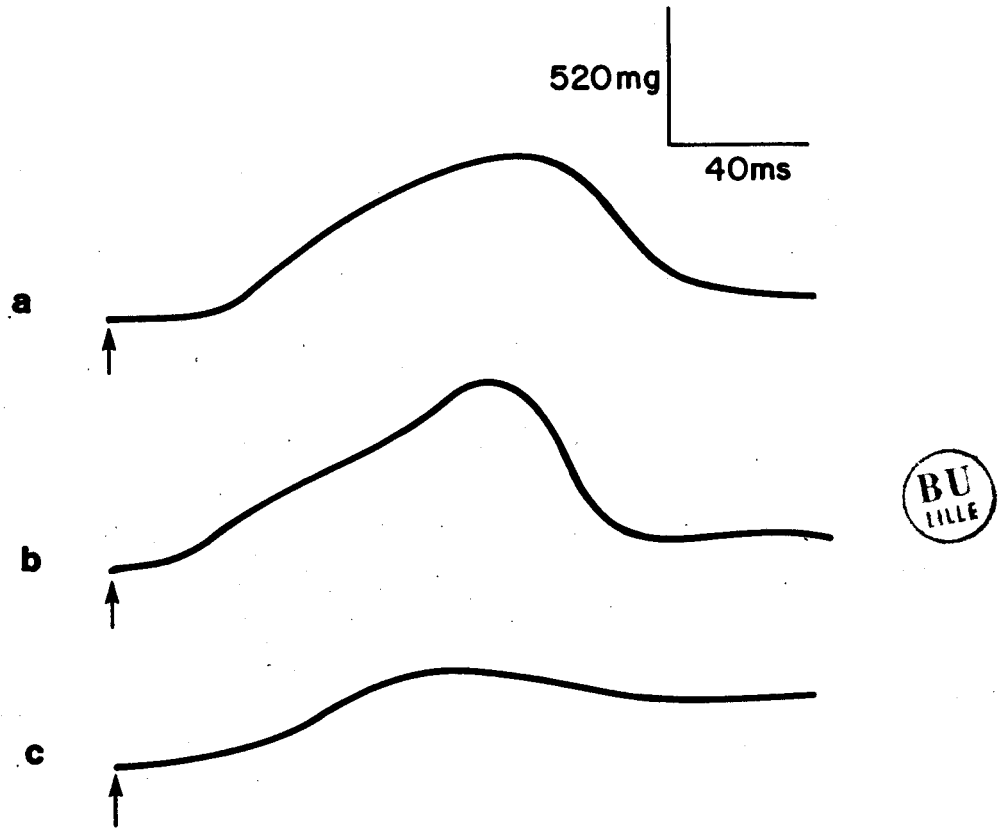


Fig 49 :

Effet de la procaine sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (22 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M)

b) idem avec  $10^{-6}$  M de procaine

c) idem avec 1 mM de procaine

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

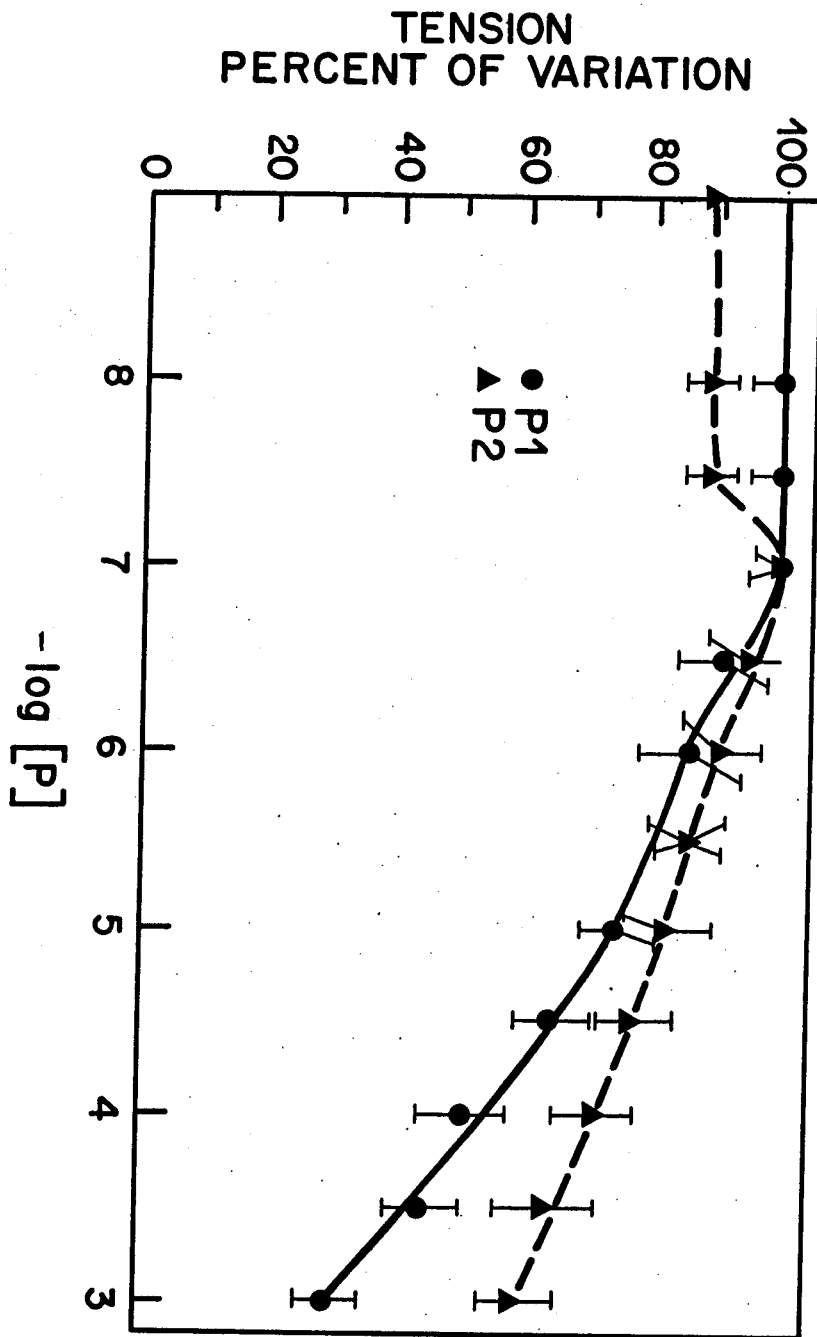


Fig 50 :

Evolution de l'amplitude des deux composantes de contraction en fonction du logarithme de la concentration en procaine.

P1 : première composante

P2 : seconde composante

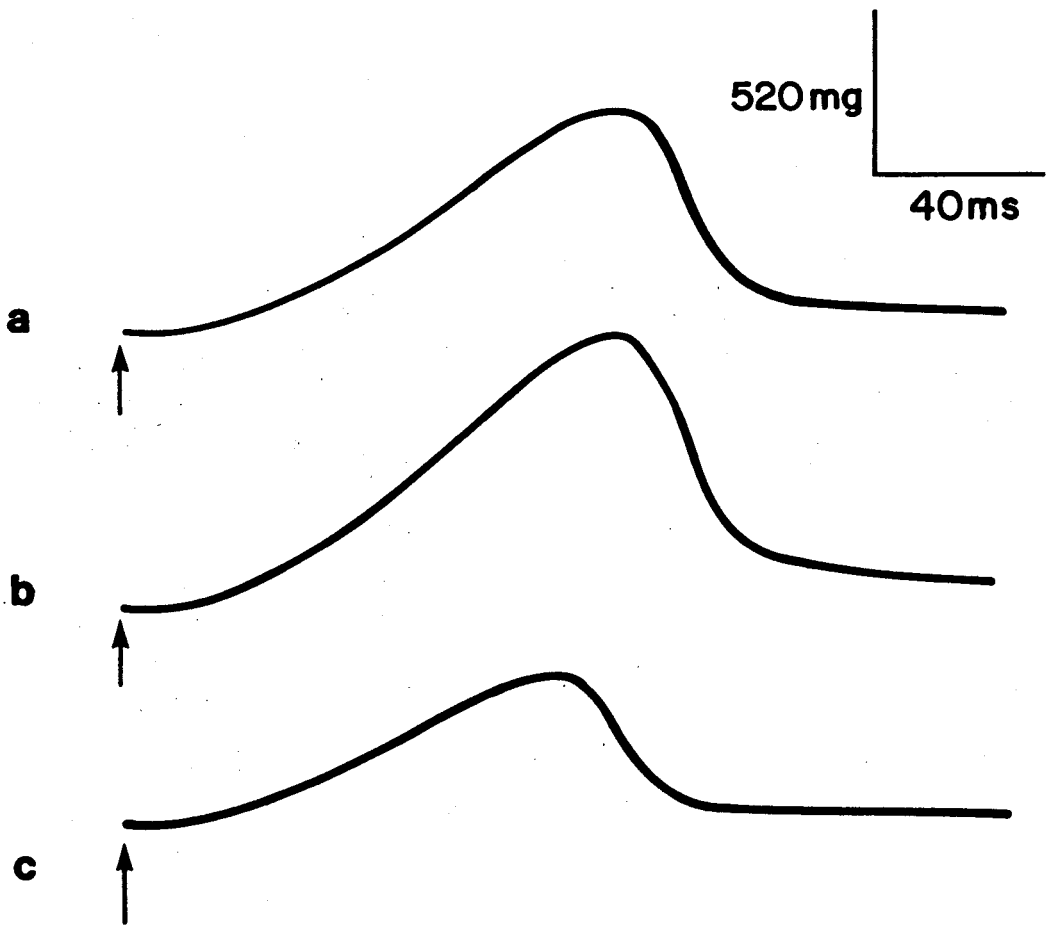


Fig 51 :

Effet de la procaine sur la seconde composante de contraction obtenue en milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol et en présence de 1 mM de caféine.

a) Solution hyperpotassique (K 22 mM) additionnée d'isoprotérénol (10<sup>-6</sup> M) en présence de 1 mM de caféine

b) idem avec 10<sup>-6</sup> M de procaine

c) idem avec 1 mM de procaine

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

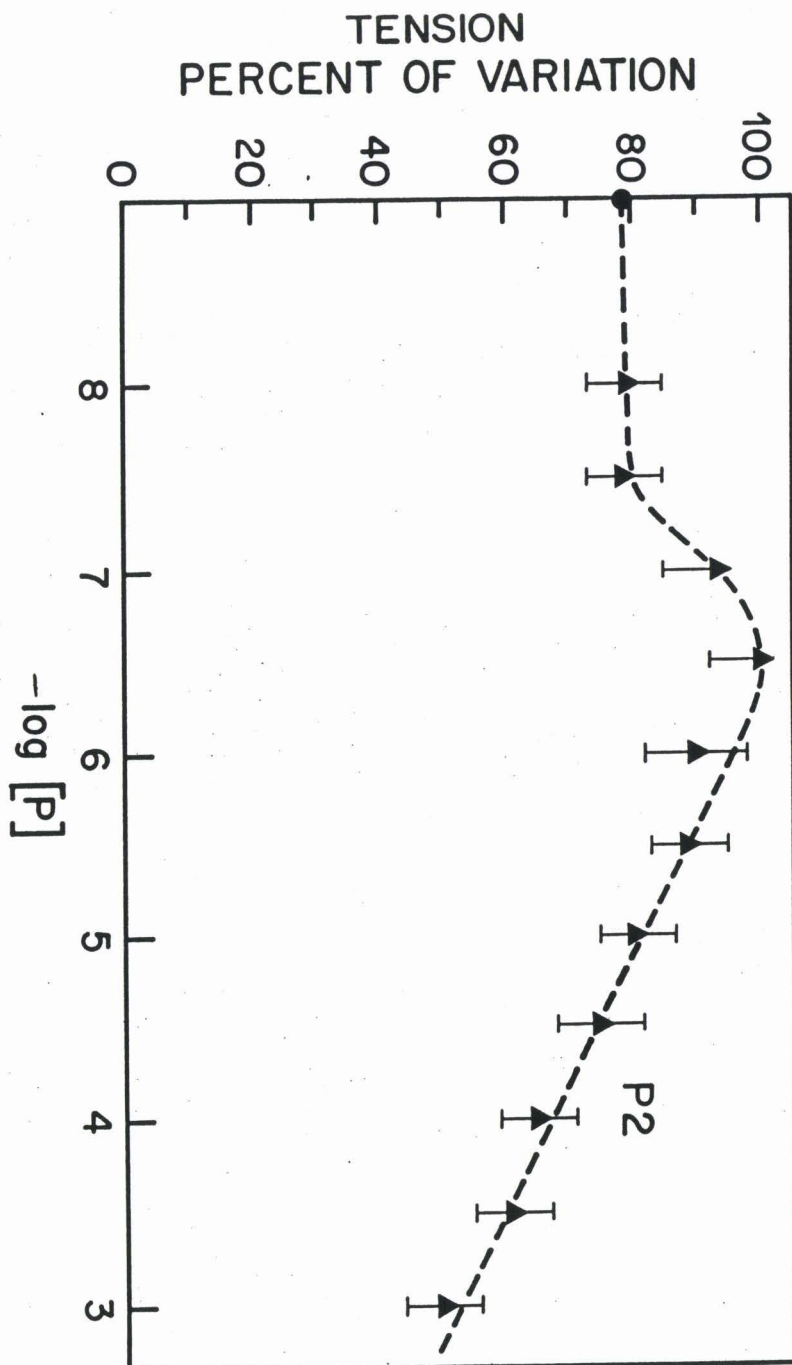


Fig 52 :

Evolution de l'amplitude de la seconde composante de contraction obtenue en milieu hyperpotassique (22 mM) additionné d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M) et en présence de 1 mM de caféine en fonction du logarithme de la concentration de procaine.

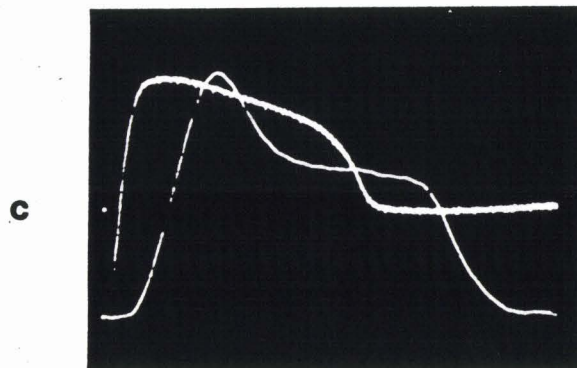
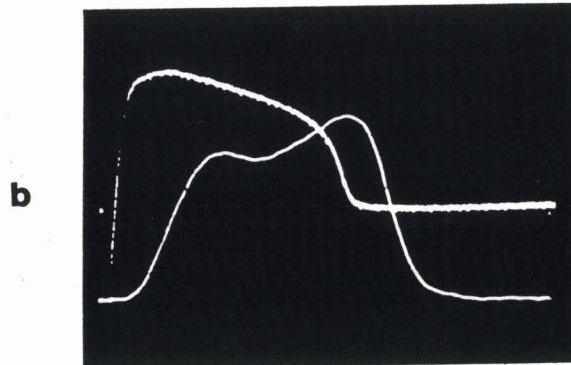
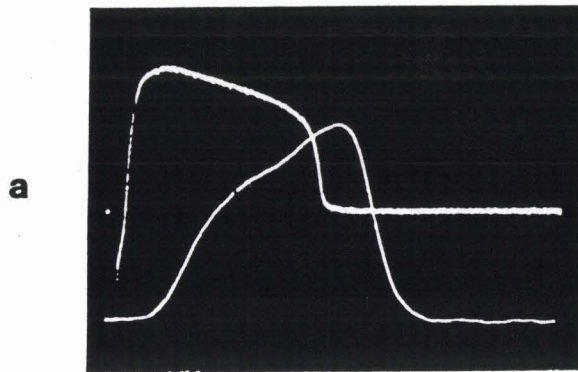
En conclusion, les résultats relatifs aux effets de la caféine et de la procaine permettent de confirmer l'hypothèse selon laquelle la première composante de contraction est liée à la libération de Ca par le RS. En effet, la caféine et la procaine, à fortes concentrations, suppriment la première composante de contraction respectivement en induisant une vidange du RS et une inhibition de la libération de Ca.

L'augmentation de l'amplitude de la première composante de contraction aux faibles concentrations de caféine serait relative à l'effet bien connu de la caféine sur l'accroissement de la libération de Ca par le RS. Aux fortes concentrations, la reprise du Ca par le RS serait bloquée entraînant ainsi la vidange du RS en Ca. La caféine augmente en outre l'amplitude de la seconde composante de contraction pour des concentrations supérieures à  $1\ \mu\text{M}$ . Cette substance agit donc bien par deux mécanismes différents sur les deux composantes de contraction. L'effet de la caféine sur la seconde composante de contraction serait directement lié à l'effet inhibiteur des phosphodiésterases conduisant ainsi à l'augmentation bien connue de la concentration intracellulaire en AMPc et de ce fait à l'activation des protéines kinases qui permettent la phosphorylation des canaux calciques. Il faut cependant signaler l'effet direct de la caféine sur les myofilaments, qui peut rendre compte d'une partie de son effet inotrope positif et que l'on relie actuellement à une augmentation de l'affinité calcique des sites de l'actomyosine (Wendt et Stephenson 1983).

La procaine à faible concentration provoque une inhibition de la conductance potassique qui se traduit par un allongement du potentiel d'action permettant une entrée accrue de Ca et de ce fait une augmentation de l'amplitude de la seconde composante de contraction. A forte concentration, la procaine par un effet non spécifique (bien connu des anesthésiques locaux) réduirait la conductance calcique entraînant ainsi une réduction de la seconde composante de contraction.

- Effets des ions TEA (n = 3).

Dans le but de déterminer les rapports éventuels entre les deux mécanismes responsables de la contraction biphasique, les effets des ions TEA sont étudiés. Le TEA permet l'augmentation notable de la durée des potentiels d'action et ainsi l'accroissement indirect de l'influx de Ca entrant correspondant au courant entrant lent dont l'inactivation au cours du temps est faible. De manière à ne pas modifier le mécanisme d'échange Na-Ca intervenant aussi dans le développement de la contraction, le TEA est ajouté à la solution de référence sous forme de chlorure sans compensation osmotique par le NaCl. En dépit de l'élévation de force ionique et de pression osmotique, les ions TEA à faible concentration (10 mM) (fig 53b), ne modifient pas l'amplitude des deux composantes de contraction. La seconde composante de contraction s'individualise cependant mieux car son temps au pic de contraction est augmenté. Cela est associé à l'augmentation de la durée du potentiel d'action. A plus forte concentration (40 mM) (fig 53c), l'amplitude de la première composante de contraction augmente de façon importante (70 % environ). La seconde composante de contraction augmente en durée et présente un plateau. Ces modifications sont



50mg | 40mV  
 100 ms

Fig 53 :

Effet du TEA sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

b) idem avec 10 mM de TEA

c) idem avec 40 mM de TEA

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction



associées à un allongement important de la durée du potentiel d'action (20 %). Cet allongement de la durée du potentiel d'action provoque le maintien du courant lent entrant de Ca entraînant une augmentation de l'amplitude de la première composante de contraction qui pourrait être liée à une charge plus importante du RS. Il faut signaler également que la seconde composante de contraction augmente en durée mais diminue en amplitude. Ceci peut refléter divers mécanismes : 1) effet de l'hypertonie provoquée par le TEA ; 2) effet d'une diminution du gradient électrochimique des ions Ca provoqué par la libération importante de Ca par le RS durant le déclenchement de la première composante ; 3) effet d'une inactivation du canal lent par le calcium qui entre dans la cellule.

- Effets de l'isoprotérénol, du BAY K 8644 et de l'acétylcholine sur la contraction biphasique.

a) Effets de l'isoprotérénol (n = 5).

Après l'inexcitabilité cellulaire obtenue en présence de 17 mM de K (fig 54b), des concentrations croissantes d'isoprotérénol sont ajoutées au milieu hyperpotassique. A la concentration de  $10^{-7}$  M, les deux composantes de contraction ont une amplitude sensiblement identique. A plus forte concentration d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M), seule est augmentée la seconde composante de contraction (fig 54 et 55). A cette augmentation de la seconde composante de contraction est associée un accroissement de l'amplitude de l'inversion de potentiel et de la durée du potentiel d'action. La seconde composante de contraction apparaît être la seule sensible à l'effet de l'isoprotérénol. La

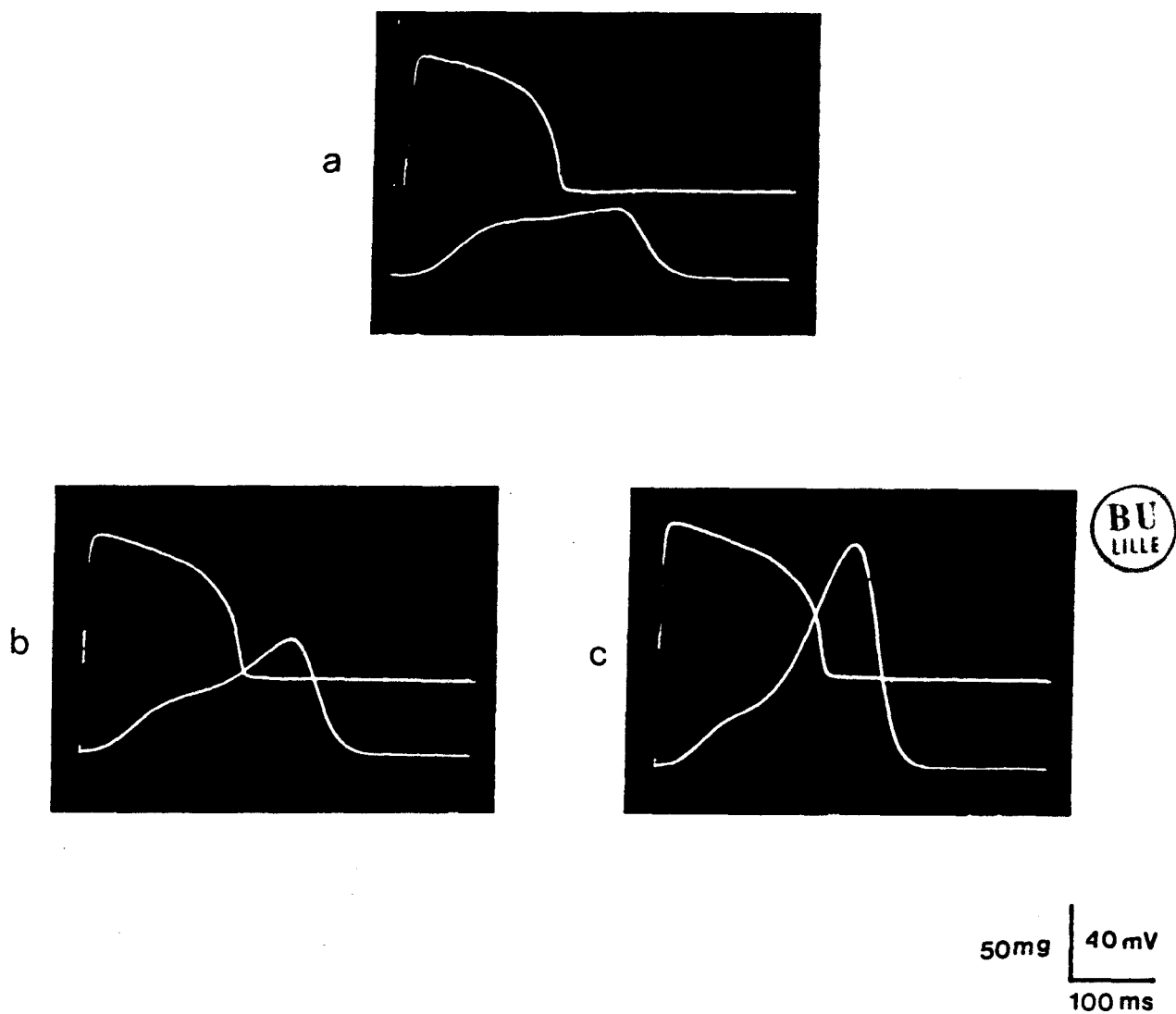


Fig 54 :

Effet de l'isoprotérénol sur la contraction biphasique

- a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-7}$  M)
- b) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)
- c) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M)

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

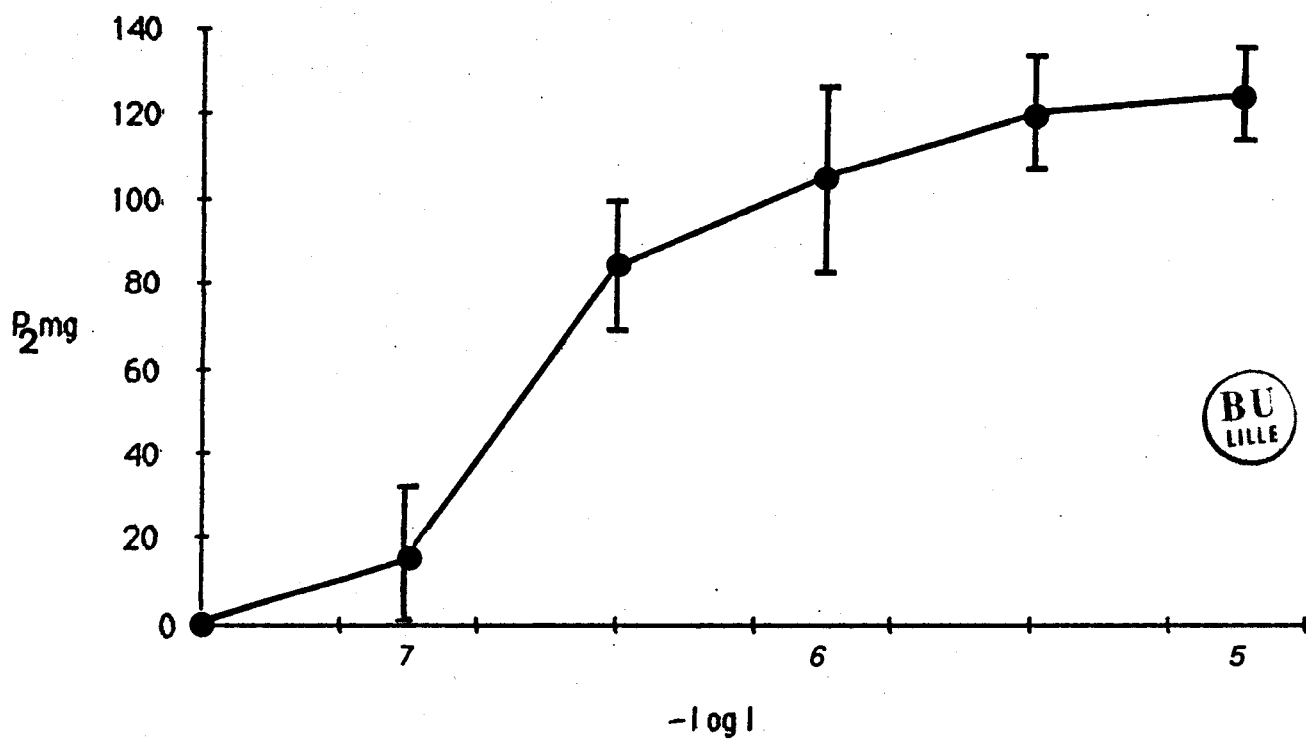


Fig 55 :

Evolution de l'amplitude de la seconde composante de contraction obtenue en milieu hyperpotassique en fonction du log de la concentration en isoprotérénol

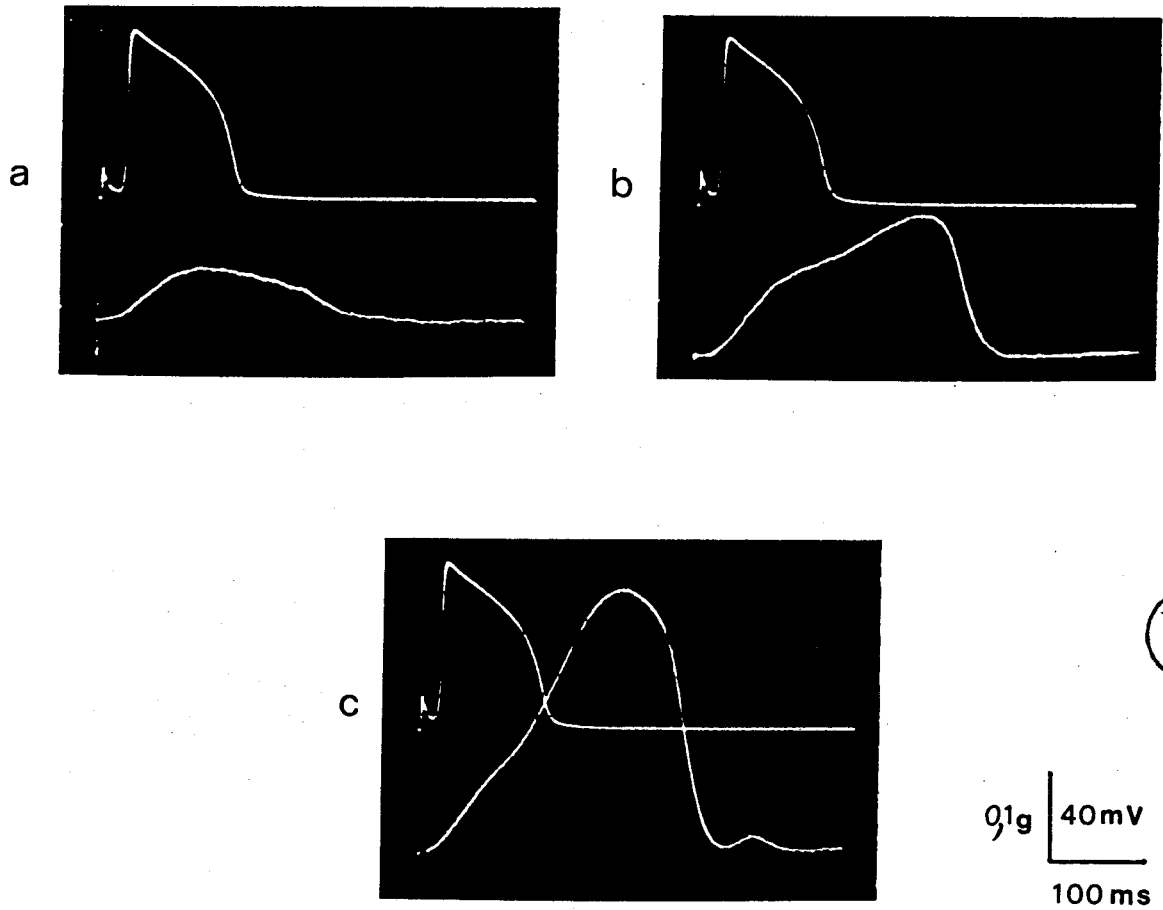


Fig 56 :

Effet de l'isoprotérénol sur la contraction biphasique  
 a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée de 0.2 mM de Ba  
 b) idem avec  $10^{-9}$  M d'isoprotérénol  
 c) idem avec  $3.10^{-9}$  M d'isoprotérénol  
 La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz  
 Tracé supérieur : potentiel d'action  
 Tracé inférieur : contraction

concentration minimale pour restaurer l'excitabilité cellulaire est de  $10^{-7}$  M. Cependant, un léger effet inotrope positif apparaît sur la première composante de contraction à la concentration d'isoprotérénol de  $10^{-9}$  M quand l'excitabilité cellulaire est préalablement restaurée par le Ba à la concentration de 0.2 mM (fig 56). Cet effet est probablement lié à l'augmentation de la prise par le RS du Ca qui entre dans la cellule via le canal lent ; le Ca intraréticulaire pouvant être ultérieurement libéré par le mécanisme de Ca-induced Ca release déclenché par le courant calcique rapide.

b) Effets du BAY K 8644 (n = 3).

Après restauration de l'excitabilité cellulaire par addition de  $10^{-7}$  M d'isoprotérénol au milieu hyperpotassique (17 mM), les effets du BAY K 8644 sont étudiés (fig 57). Le BAY K 8644 augmente l'amplitude de la seconde composante de contraction. Cette augmentation est contemporaine d'une augmentation de la durée et de l'amplitude de l'inversion de potentiel du potentiel d'action. L'effet du BAY K 8644 est superposable à celui de l'isoprotérénol puisqu'il permet la modulation des canaux calciques lents. Ceci est en accord avec les récents travaux de Noble (1984), Brown (1984), Bean (1985) et Nilius et al (1985).

c) Effets de l'acétylcholine (n = 3).

La figure 58 montre que l'acétylcholine agit principalement sur la seconde composante de contraction. Les effets sont d'autant plus

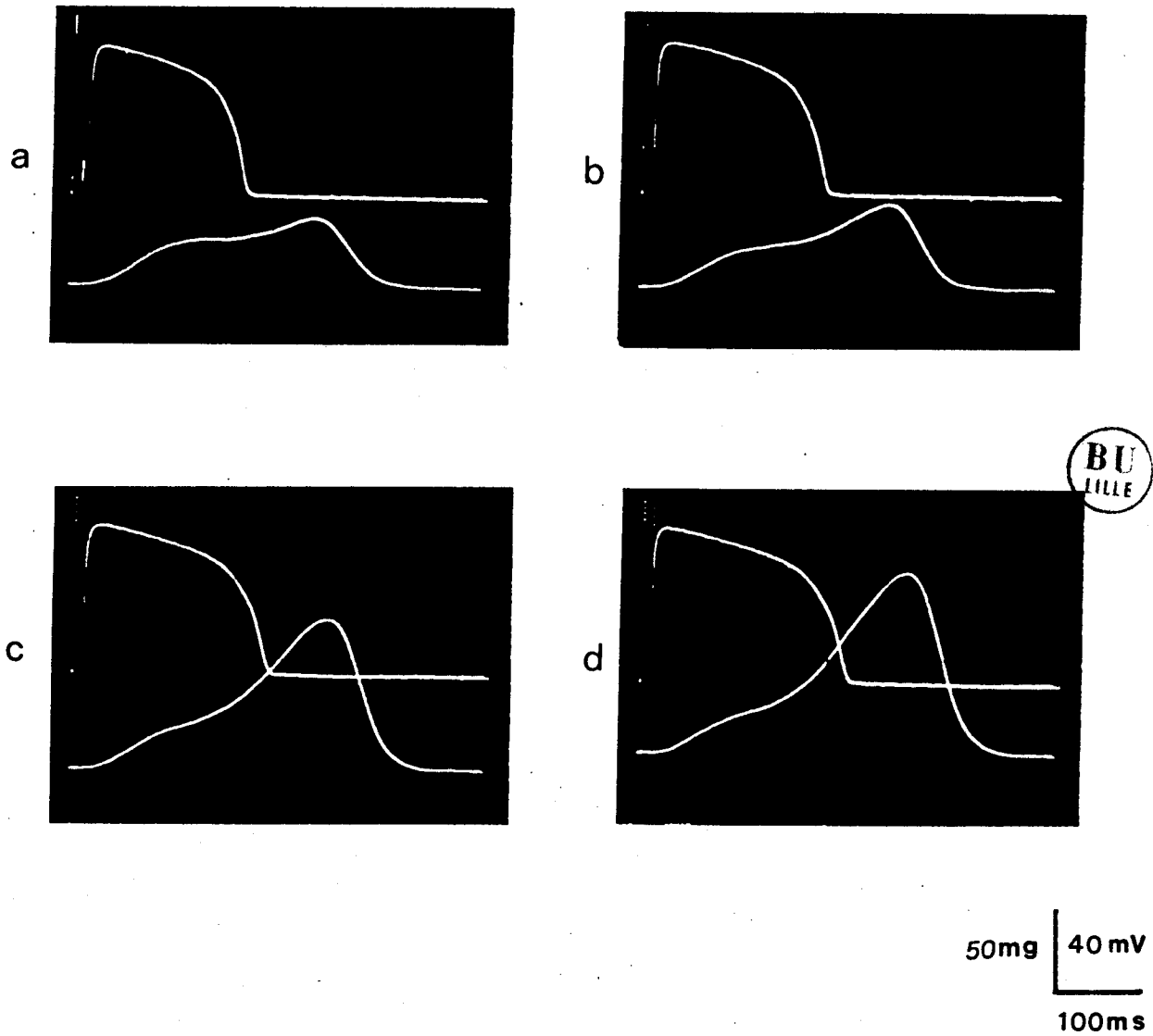


Fig 57 :

Effet du BAY K 8644 sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-7}$  M)

b) idem avec  $10^{-7}$  M de BAY K 8644

c) idem avec  $3 \cdot 10^{-7}$  M de BAY K 8644

d) idem avec  $10^{-6}$  M de BAY K 8644

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

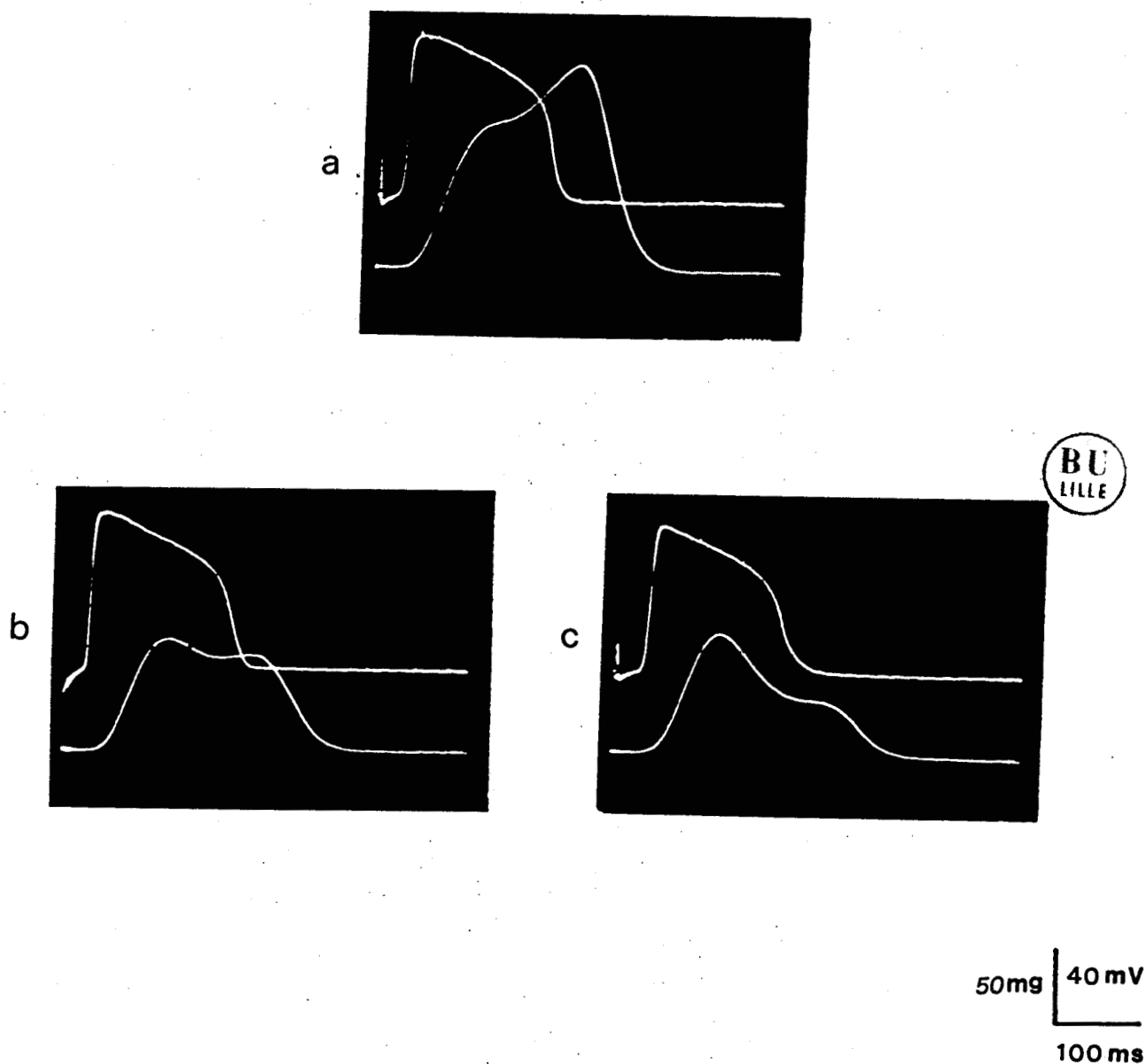


Fig 58 :

Effet de l'acétylcholine sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

b) idem avec  $3 \cdot 10^{-7}$  M d'acétylcholine

c) idem avec  $10^{-6}$  M d'acétylcholine

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

marqués que la concentration est plus élevée. A la diminution d'amplitude de la seconde composante de contraction est associée une diminution de l'amplitude de l'inversion de potentiel et de la durée du potentiel d'action.

En accord avec les données de la littérature, l'effet de l'acétylcholine sur les cellules ventriculaires serait double : 1) diminution de la disponibilité des canaux calciques lents (reflétée par la diminution de l'amplitude de l'inversion de potentiel) ; 2) augmentation de la conductance potassique (reflétée par la diminution de durée du potentiel d'action). L'augmentation de la conductance potassique conduirait bien à une diminution de l'entrée du Ca passant par les canaux lents. Le site d'action de l'acétylcholine correspondrait à celui de l'isoprotérénol puisque, avec des effets opposés, ces deux substances agissent en modulant principalement l'amplitude de la seconde composante de contraction, c'est-à-dire le canal calcique lent. La régulation de l'amplitude de la contraction biphasique se réalise donc par une action directe des substances (en particulier les neuromédiateurs) sur les canaux lents.

Il faut cependant souligner que l'amplitude de la première composante peut aussi être modulée mais de façon indirecte par le courant entrant calcique lent (charge du RS en Ca). Il semble donc que la régulation "fine" de la contraction se fasse par l'intermédiaire d'une action directe sur le courant entrant lent. La régulation plus indirecte de la première composante s'effectuerait, semble-t-il, dans des conditions particulières d'expérience (effet du TEA, effet de l'absence de Na) correspondant généralement à une "surcharge calcique".



- Effets de l'hypoxie sur la contraction biphasique (n = 3).

La figure 59 illustre les effets de l'hypoxie sur les activités électrique et mécanique du muscle papillaire de cobaye placé initialement dans les conditions de référence (fig 59a) (PO<sub>2</sub> : 510 mm Hg) puis en hypoxie (fig 59b) (PO<sub>2</sub> : 120 mmHg). L'hypoxie entraîne une diminution de l'amplitude de l'inversion de potentiel et de la durée du potentiel d'action et une diminution de l'amplitude de la seconde composante de contraction. Ce résultat confirme bien l'hypothèse selon laquelle l'amplitude de la seconde composante de contraction est directement associée à la durée et à l'inversion de potentiel du potentiel d'action. De plus l'hypoxie est bien connue pour diminuer le stock intracellulaire en ATP et par conséquent la concentration intracellulaire en AMPc. La sensibilité des canaux lents (seconde composante de contraction) à la concentration intracellulaire en AMPc semble ainsi confirmée.

- Relation structure-fonction.

Le but de cette expérimentation est de montrer que : 1) la pauvreté ou la richesse en RS des diverses préparations cardiaques interrogés conditionne l'amplitude de la première composante de contraction ; 2) l'amplitude et la durée du courant entrant lent calcique reflétées par le plateau du potentiel d'action est associée à l'amplitude de la seconde composante de contraction.

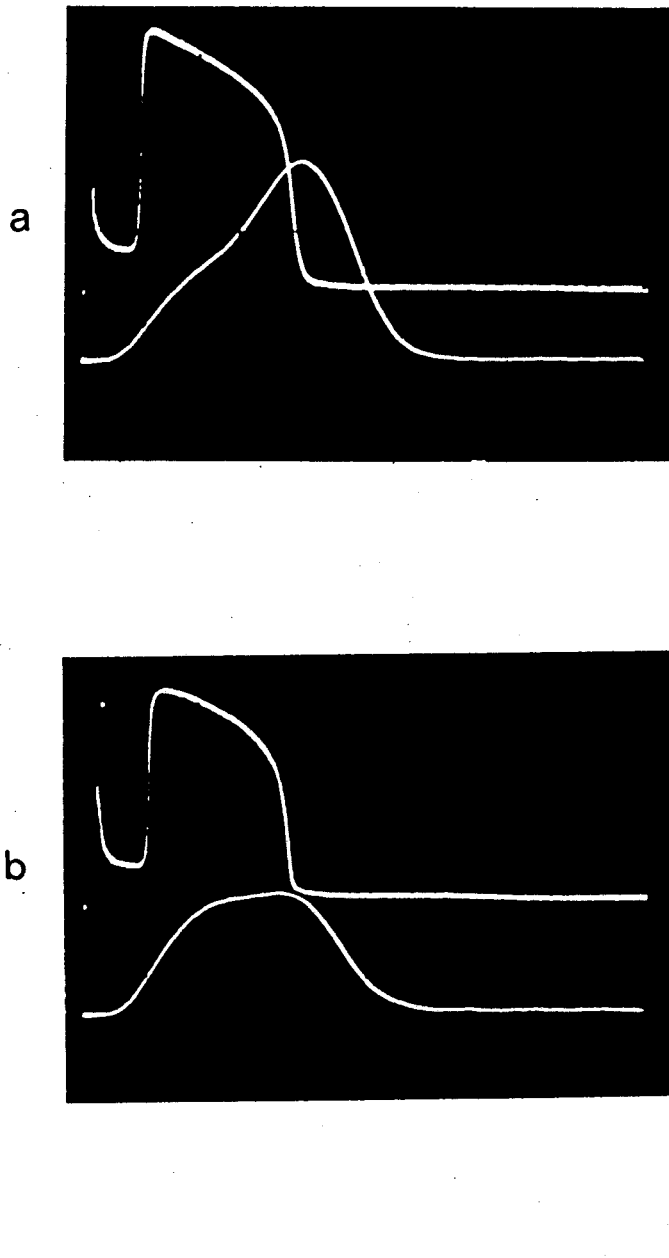


Fig 59 :

Effet de l'hypoxie sur la contraction biphasique

a) Solution hyperpotassique additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) en présence d'une  $P_{O_2}$  de 510 mmHg

b) Solution hyperpotassique additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M) en présence d'une  $P_{O_2}$  de 120 mmHg après 1 minute.

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

a) Muscle papillaire de rat (n = 7).

Les cellules myocardiques de rat sont connues pour être riches en RS. A cette richesse relative en RS est associée un potentiel d'action ne présentant pas de plateau (fig 60) et dont la durée mesurée à 50% de la repolarisation n'est que de  $33 \pm 3$  ms. En milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol, la contraction correspondante est monophasique. Seule est présente la première composante de contraction estimée par le temps au pic de contraction ( $90 \pm 8$  ms à la fréquence de stimulation de 0.6 Hz) et par les effets de la caféine (1 mM) qui diminue notablement l'amplitude de la contraction (fig 61).

b) Oreillette de Cobaye (n = 9).

Dans les conditions de référence, il est possible d'enregistrer une contraction monophasique dont le temps au pic de contraction n'est que de  $88 \pm 5$  ms, correspondant ainsi à la première composante de contraction (fig 62b). Comme pour les cellules myocardiques ventriculaires de rat, le décours du potentiel d'action est triangulaire. La durée du potentiel d'action mesurée à 50% de la repolarisation est de  $30 \pm 6$  ms. Lorsqu'un allongement du potentiel d'action est provoqué par l'addition d'ions TEA (60 mM) au milieu de référence, la contraction reste monophasique bien que d'amplitude supérieure (fig 62c). Ce rôle majeur de la première composante de contraction dans le déroulement de l'activité mécanique de l'oreillette de cobaye est aussi confirmé par l'étude de l'effet du remplacement des

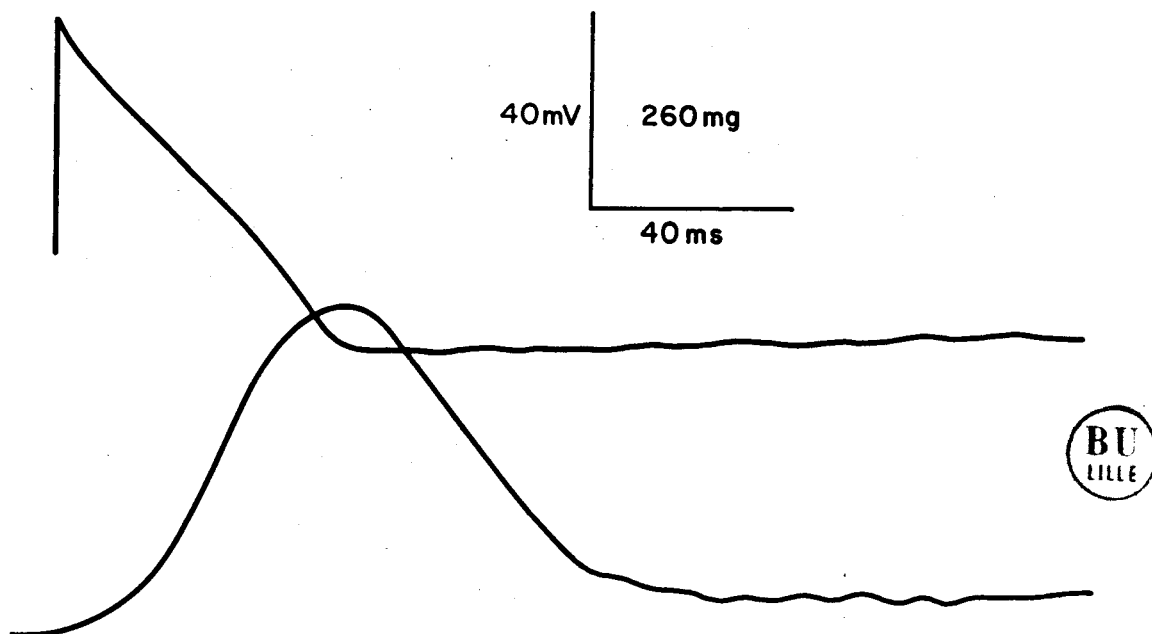


Fig 60 :

Décours du potentiel d'action et de la contraction du muscle papillaire de rat placé en conditions hyperpotassiques (22 mM) et en présence d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M)

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

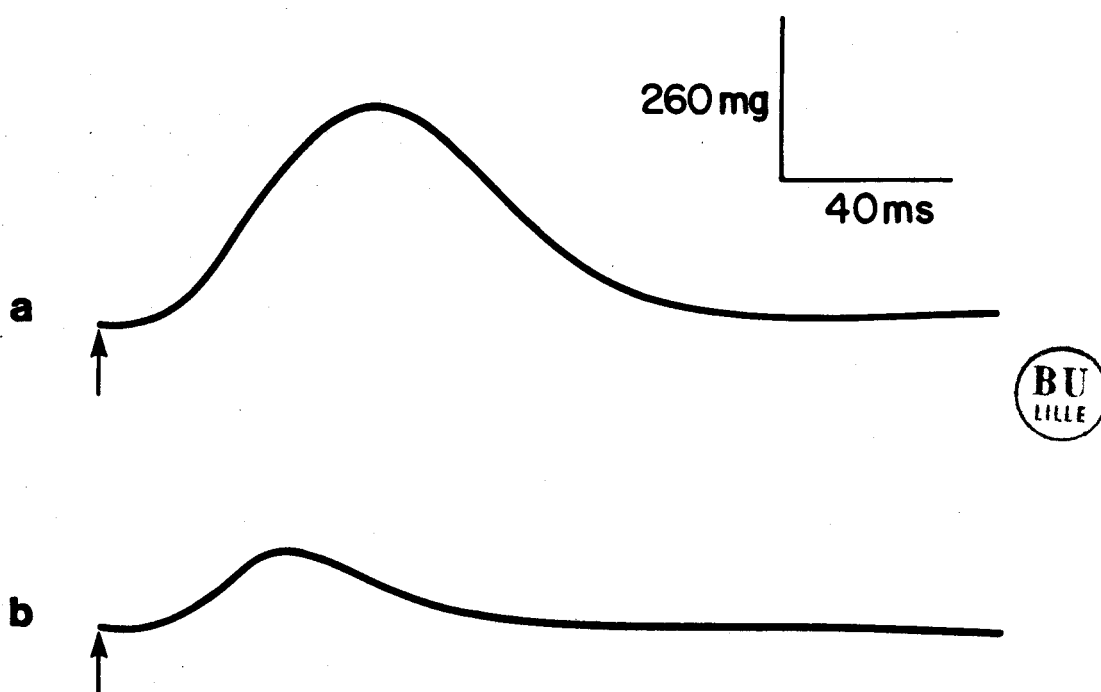


Fig 61 :

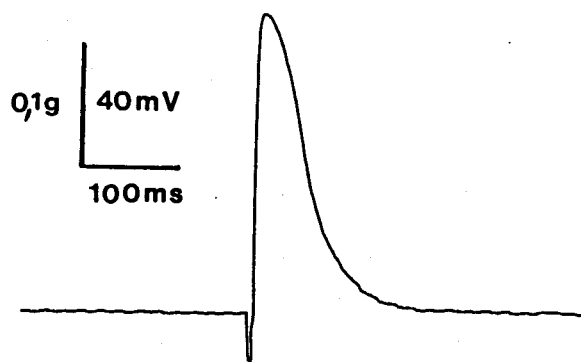
Effet de la caféine sur la contraction du muscle papillaire de rat  
 a) Solution hyperpotassique (22 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M)  
 b) idem avec 1 mM de caféine  
 La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz  
 Tracé supérieur : potentiel d'action  
 Tracé inférieur : contraction

ions Ca par les ions Sr. Comme les ions Sr empruntent préférentiellement le canal lent plutôt que le canal rapide (voir ci-dessus), il apparaît dans ces conditions logique d'observer la disparition de la contraction de l'oreillette de cobaye comme l'illustre la figure 63. Un faible apport de Ca (0.1 mM) restaure la contraction montrant que le Ca passant par le canal rapide permet la libération des ions Sr du RS (fig 63f, g, h).

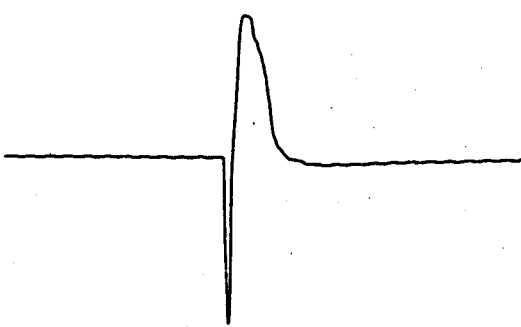
c) Myocarde ventriculaire de grenouille (n = 6).

La pauvreté en RS du myocarde de grenouille est bien décrite (Page et al, 1971 ; Page, 1978). Ainsi, en milieu hyperpotassique additionné d'isoprotérénol, la contraction est monophasique, seule est présente la seconde composante de contraction (fig 64) comme en témoigne le temps au pic de contraction qui est de  $805 \pm 49$  ms à la fréquence de stimulation de 0.6 Hz pour une température de 22°C. Le potentiel d'action a une durée de  $510 \pm 49$  ms. La caféine exerce seulement un très faible effet inotrope négatif qui s'explique par la pauvreté en RS de cette structure (fig 65).

En résumé ces derniers résultats apportent des éléments complémentaires en faveur de l'existence de deux influx calciques responsables chacun du déclenchement d'une composante de contraction : 1) par le canal calcique rapide non sensible aux diverses drogues, le courant entrant calcique rapide permet la stimulation du RS selon le mécanisme de Ca-induced Ca release qui produit la première composante de contraction ; 2) par le canal calcique lent, le courant entrant calcique sensible à diverses drogues, permet d'une part, la stimulation



(a)

BU  
LILLE

(b)



(c)

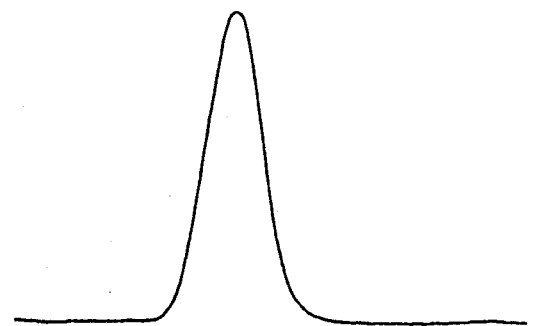


Fig 62 :

Décours du potentiel d'action et de la contraction de l'oreillette de cobaye.

a) Solution de Tyrode

b) Solution hyperpotassique (17 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $3 \cdot 10^{-7}$  M)

c) idem avec 60 mM de TEA

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

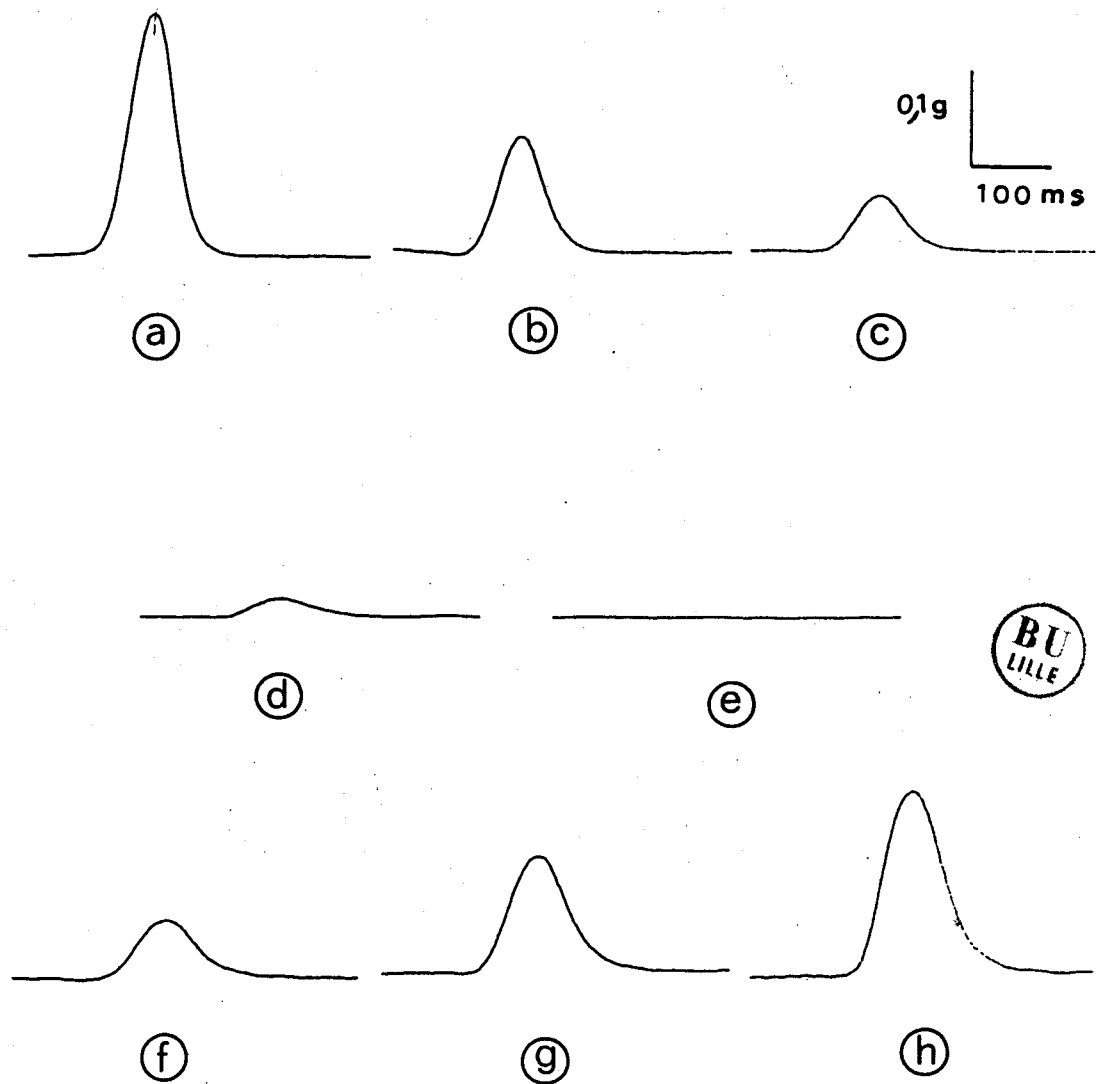


Fig 63 :

Effet d'une substitution du Ca par le Sr sur l'oreillette de cobaye

a) Solution de Tyrode

b) Solution hyperpotassique (17 mM) en présence de 1.8 mM de Sr et en absence de Ca après 1 minutes

c) idem après 3 minutes

d) idem après 4 minutes

e) idem après 5 minutes

f) idem avec 0.1 mM de Ca

g) idem avec 0.2 mM de Ca

h) idem avec 0.5 mM de Ca

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz



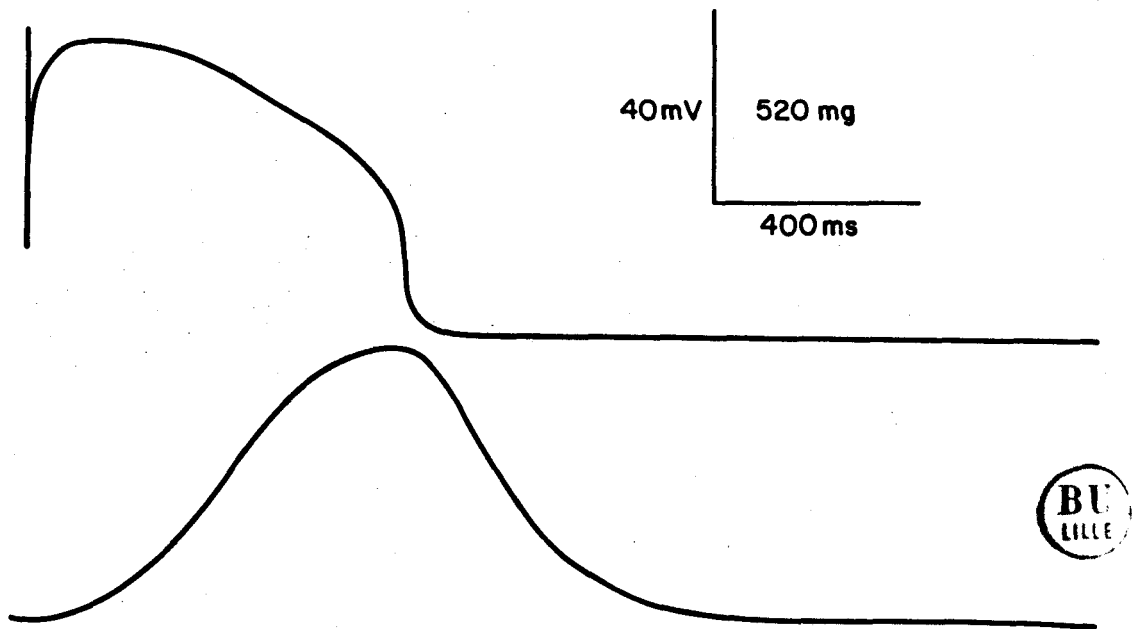


Fig 64 :

Décours du potentiel d'action et de la contraction du trabécule ventriculaire de grenouille placé en conditions hyperpotassique (22 mM) additionné d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M) à la température de 22°C.

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

Tracé supérieur : potentiel d'action

Tracé inférieur : contraction

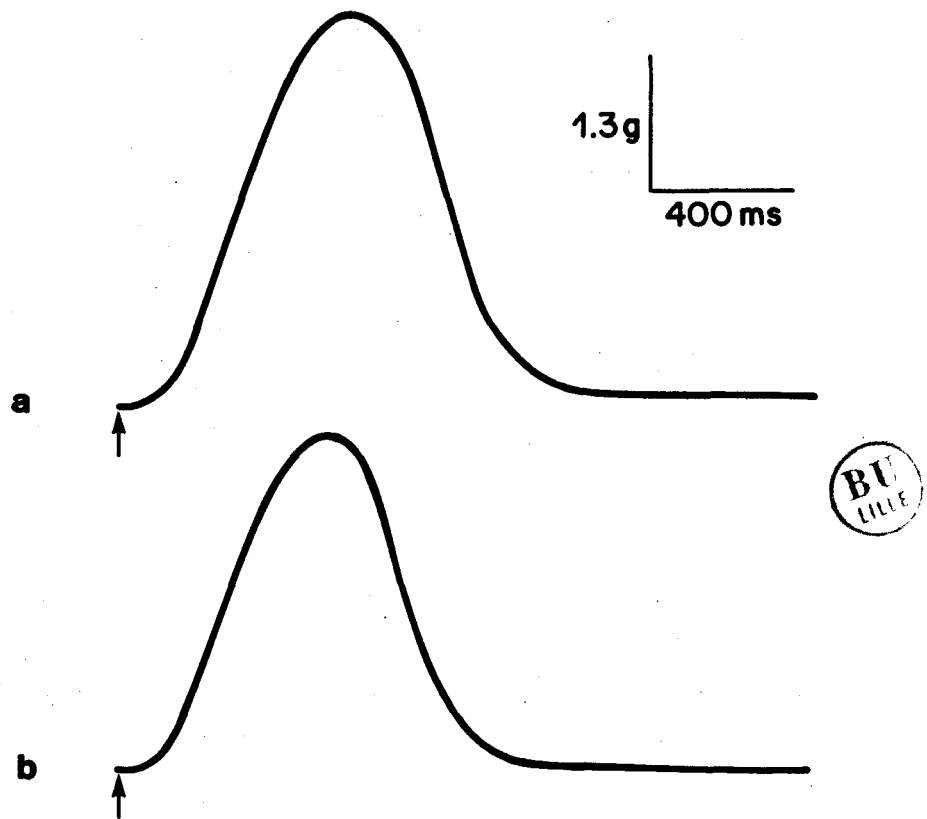


Fig 65 :

Effet de la caféine sur la contraction du trabécule ventriculaire de grenouille

a) Solution hyperpotassique (22 mM) additionnée d'isoprotérénol ( $10^{-6}$  M)

b) idem avec 1 mM de caféine

La fréquence de stimulation est de 0.6 Hz

directe des protéines contractiles contrôlant ainsi l'amplitude de la seconde composante de contraction (régulation fine) et d'autre part, le contrôle de la première composante de contraction par le biais de la régulation de la charge du RS en Ca (régulation indirecte).

## DISCUSSION

L'origine des ions Ca impliqués dans la génèse des contractions des cellules cardiaques est encore controversée. Dans le coeur, à l'opposé du muscle squelettique, la suppression du Ca du milieu extracellulaire conduit en quelques minutes à une abolition complète de la contraction (Ringer, 1883 ; Rich et Langer 1975). Pour Langer (1974) les ions Ca qui sont à l'origine de la contraction des cellules cardiaques proviennent du sarcolemme. Cette hypothèse est cependant en désaccord avec celle énoncée plus récemment selon laquelle le Ca est libéré par le RS (Bassinghtwaighte et Reuter, 1972 ; Fabiato et Fabiato, 1979). Ces deux hypothèses bien que différentes en ce qui concerne l'origine du Ca proposent cependant l'existence d'un seul site de libération du Ca.

Dès 1976, Allen et al suggèrent que le Ca peut être libéré à partir du réticulum sarcoplasmique en deux temps. Plus récemment King et Bose (1983), Malécot et al (1984), Bogdanov (1978), Honoré et Challice (1985, 1986), Honoré et al (1986a,b,c) proposent que la contraction biphasique est déclenchée par les ions Ca provenant de deux sources différentes. En analysant les contributions relatives du Ca provenant du RS et du milieu extracellulaire, Bers (1985) conclut que, durant le potentiel d'action, le Ca peut effectivement provenir de ces deux sources. Reuter (1974) calcule que le Ca entrant dans la cellule durant un potentiel d'action provoque une augmentation de l'activité du Ca intracellulaire de 1 à 5  $\mu$ M. En tenant compte des résultats en particulier de Solaro et al (1974) concernant la relation liant la tension mécanique des myofilaments à la concentration de Ca, Reuter

conclut que cet apport est insuffisant pour produire une contraction. Il semble que Reuter (1974) ait sous-estimé probablement la quantité de Ca entrant dans la cellule durant le potentiel d'action puisque le courant calcique qu'il enregistre dans des conditions de potentiel imposé au niveau de préparations multicellulaires est de faible amplitude comparée à celui enregistré sur une cellule cardiaque isolée (Isenberg et Klockner, 1982). A l'inverse, Fabiato (1985) montre, par la simulation du courant de Ca correspondant à celui enregistré sur cellule isolée, que cette quantité de Ca entrant est suffisante pour permettre le développement de la contraction (30% de la tension maximale) au niveau de la fibre pelée traitée par le Brij donc sans RS fonctionnel. Ces données montrent que le Ca entrant dans la cellule peut directement activer les protéines contractiles, sans qu'il soit obligatoirement nécessaire de passer par un système amplificateur tel que le RS.

L'analyse de la littérature permet donc de supposer que la contraction peut être déclenchée par du Ca provenant de 4 sources : 1) le RS (Fabiato, 1985) ; 2) le sarcolemme (Langer, 1979) ; 3) le milieu extracellulaire via les canaux calciques (Lee et al, 1984 ; Mitchell et al, 1983 ; Bers, 1985 ; Fabiato, 1985) ; 4) le milieu extracellulaire via l'échange Na-Ca (Vassort et Rougier, 1972 ; Horackova, 1984).

Nos résultats montrent que la contraction du muscle papillaire de cobaye présente, en milieu hyperpotassique et en présence d'isoprotérénol, deux composantes de contraction qui sont influencées différemment selon les manoeuvres expérimentales.

Notre étude a eu pour but de préciser l'origine de ces deux composantes de contraction du muscle papillaire de cobaye. Elle démontre que ces deux composantes sont déclenchées par deux courants entrants de Ca.

- Rôle de l'échange Na-Ca dans le développement de la contraction biphasique.

Lorsque tout le Na du milieu extracellulaire est remplacé par du Li, une contracture se développe après 5 minutes de perfusion provoquant l'inexcitabilité cellulaire. Niedergerke (1958, 1963), Horackova et Vassort (1979), Horackova (1984) observent que l'effet contracturant de solutions sans sodium est dû à un influx de Ca via le mécanisme d'échange Na-Ca. Mullins (1981) montre que la réduction du Na extracellulaire provoque une diminution de  $E_{Na}$  et ainsi une diminution du potentiel d'inversion du courant d'échange Na-Ca. Le sens du courant est donné par la différence de potentiel suivante :  $2E_{Na} - E_{Ca} - E_m$  en supposant que 4 ions Na sont échangés contre un seul ion Ca. Quand la concentration externe en Na est réduite ( $2E_{Na} - E_{Ca} - E_m$ ) devient négatif et ainsi facilite l'entrée du Ca via ce mécanisme d'échange Na-Ca.

Afin d'éviter le développement de la contracture induite par la suppression totale du sodium, une solution ne contenant que 25 mM de Na, (le reste du Na étant remplacé par du Li) est utilisée. Après une augmentation initiale importante de l'amplitude de la contraction, celle-ci se stabilise à une valeur d'environ 50% supérieure à la valeur

initiale. De ce fait, l'augmentation d'amplitude de la contraction en milieu hyposodique correspond à une charge en Ca plus importante de la cellule que dans les conditions de référence. Parallèlement est observé une réduction importante de l'amplitude et de la durée du PA. Ce résultat indique que dans ces conditions, la pile d'équilibre aux ions Ca est vraisemblablement plus faible. Si l'emploi de ce milieu hyposodique présente l'avantage d'éviter la contracture, il ne permet cependant l'obtention que d'une contraction monophasique.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'obtention d'une contraction monophasique : 1) dans les conditions de référence, la première composante de contraction dépendrait de l'influx de Ca s'écoulant au travers des canaux calciques et la seconde de l'influx de Ca via l'échange Na-Ca ; 2) le blocage du mécanisme d'échange Na-Ca permettrait le développement de 2 composantes de contraction mais ces deux composantes seraient "fusionnées" ou la seconde inexistante du fait d'une charge calcique intracellulaire importante. Le blocage de l'échange Na-Ca entraînant une diminution du gradient électrochimique des ions Ca, l'augmentation de l'activité Ca intracellulaire activerait le courant sortant transitoire de K (Bassinghtwaighte et al, 1975, Isenberg 1977) avec pour conséquence la diminution de la durée du potentiel d'action.

La contraction monophasique observée en milieu hyposodique devient biphasique lorsque les ions Li sont ensuite remplacés en partie par les ions TEA (de 10 à 60 mM). Les ions TEA bloquent pour une très large part les courants sortants dynamiques et favorisent ainsi l'augmentation de la durée du potentiel d'action qui assure le maintien

de la composante lente du courant entrant de Ca et donc le maintien de la seconde composante de contraction.

Il semble donc que le mécanisme d'échange Na-Ca ne puisse-être invoqué dans le déclenchement de la contraction biphasique en conditions de référence puisque son inhibition ne transforme pas la contraction biphasique en contraction monophasique.

- Rôle des deux courants entrants de Ca dans le développement de la contraction biphasique.

Dans le but de déterminer si les deux composantes de contraction sont bien dues à deux influx de Ca s'écoulant au travers des canaux calciques, la dépendance de ces deux composantes de contraction vis-à-vis du potentiel de membrane est analysée. Les relations liant l'amplitude normalisée de chaque composante au potentiel de membrane sont de type sigmoïde et correspondent très exactement à celles traduisant pour l'une la disponibilité de la conductance calcique rapide et pour l'autre la disponibilité de la conductance calcique lente (Bean, 1985).

En effet, pour Bean (1985) la disponibilité de la conductance calcique rapide est nulle pour des potentiels faiblement négatifs (-35 mV) et la disponibilité de la conductance lente est encore importante à ce potentiel. Les résultats rapportés dans ce travail montrent également que la disponibilité de la première composante de contraction est nulle pour la même valeur de potentiel (-35 mV) et que celle de la seconde composante de contraction est encore de 50% à ce potentiel.



L'étude des effets des inhibiteurs calciques confirme l'existence de deux populations de canaux. Le Mn inhibe les deux composantes de contraction avec la même efficacité. Par contre la nifédipine et le Cd en particulier sont plus spécifiques puisqu'ils inhibent seulement la seconde composante de contraction. Nilius et al (1985) et Bean (1985) montrent que les dihydropyridines sont des inhibiteurs spécifiques du canal calcique lent alors que le Co bloque les deux types de canaux comme le Mn bloque les deux composantes de contraction.

Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle les deux composantes de contraction sont bien dues à deux influx de Ca. L'échange Na-Ca ne serait pas nécessaire au développement de la contraction biphasique et, étant donné le niveau de polarisation membranaire diastolique, un influx sodique ne peut être invoqué, impliquant l'annulation du mécanisme de "Na-induced Ca release" (Bonvallet et al, 1985, Harrisson et Miller 1985). Ceci est confirmé en outre par le fait que la TTX ne modifie pas le décours et l'amplitude de la contraction biphasique.

- Origine de la première composante de contraction.

La relation liant l'amplitude de la première composante de contraction au logarithme de la concentration externe en Ca est de type complexe. Ces données laissent donc supposer qu'un relai existe pour rendre compte du développement de cette composante de contraction.

Lorsque le calcium est remplacé en totalité par le Sr, la première composante de contraction disparaît. Aucune contracture n'apparaît puisque à l'inverse du Ba, le Sr peut remplacer le Ca au niveau du mécanisme d'échange Na-Ca (Van Kerkhove et Carmeliet, 1971). Ces résultats sont tout-à-fait en accord avec ceux de King et Bose (1983) qui montrent qu'en présence de Sr et en l'absence de Ca la première composante est absente mais peut réapparaître quand est ajoutée une faible quantité de Ca (0.1 mM).

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de la première composante de contraction en présence de Sr : 1) le Sr ne passe pas par le canal calcique rapide et ainsi ce courant rapide non présent ne peut déclencher la libération de Ca par le RS ; 2) le Sr pénétrant par le canal rapide dans le milieu intracellulaire serait inefficace pour permettre la libération d'ions divalents par le RS.

Dans la mesure où les ions Ba peuvent emprunter le canal calcique rapide et dans la mesure où le courant de Ba est identique à celui de Ca (Bean, 1985 ; Nilius et al, 1985) il est permis de penser qu'il en est de même avec le Sr et que dans ces conditions, le courant de Sr passant par le canal rapide serait incapable de déclencher la libération des ions Sr par le RS. En effet, Endo (1970) montre que les ions Sr sont 20 fois moins efficaces pour déclencher une libération de cations divalents par le RS. De plus, Winegrad (1973) montre que le RS peut stocker 20 fois plus de Sr que de Ca. Enfin, Donaldson et al (1978) et Kernick et al (1980) décrivent une efficacité identique du Ca et du Sr au niveau des protéines contractiles.

Etant donné que d'une part l'amplitude de la première composante de contraction n'est pas reliée linéairement à l'amplitude de l'inversion de potentiel (donc au log de la concentration extracellulaire en calcium) et que d'autre part cette première composante est abolie en présence de Sr et en l'absence totale de Ca, on peut conclure à l'existence d'un relai pour le déclenchement de cette première composante de contraction entre l'influx calcique et l'activation des protéines contractiles. Ce relai correspondrait à la libération de Ca par le RS qui serait donc un système amplificateur du courant entrant calcique rapide.

La nécessité d'un relai est renforcée par les relations de type sigmoïde liant d'une part l'amplitude de l'inversion de potentiel et d'autre part la durée du PA à l'amplitude de la première composante. Après une longue période de quiescence (15 minutes), au cours de laquelle le RS s'est vidé de son contenu en Ca (Blinks et Koch-Weser, 1961 ; Allen et al, 1976 ; Beresewicz et Reuter, 1977 ; Wohlfart et Noble, 1982) la première composante est absente. Dès lors il est permis de proposer que la première composante de contraction soit dûe à une libération de Ca par le RS. Comme cette composante dépend aussi du courant calcique rapide, il peut être suggéré que le courant calcique rapide induit la libération de Ca par le RS selon le mécanisme Ca-induced Ca release (Fabiato, 1985).

La caféine à faible concentration augmente l'amplitude de la première composante de contraction alors qu'à forte concentration elle l'inhibe. Trois mécanismes peuvent être invoqués pour expliquer l'augmentation de l'amplitude de la première composante aux faibles concentrations de caféine : 1) augmentation de la phosphorylation des canaux (Sutherland et Rall, 1958 ; Butcher et Sutherland, 1962 ; Blinks et al, 1972 ; Goto et al, 1979 ; Yatani et al, 1984 ; Bers, 1985 ; 2) augmentation de la libération de Ca par le RS (Herz et Weber, 1965 ; Ogawa, 1970) ; 3) effet direct sur les myofilaments (Wendt et Stephenson, 1983). Par contre, à forte concentration la caféine entraîne une augmentation de la libération du Ca par le RS et une inhibition de sa reprise (Herz et Weber, 1965 ; Ogawa, 1970). La vidange du RS de Ca par cette forte concentration de caféine explique l'inhibition de la première composante.

La procaine exerce un effet inhibiteur sur la première composante de contraction à toutes les concentrations étudiées. Selon Caputo (1976), Caputo et Dipolo (1978), Suarez-Kurtz et Sorenson (1979), Suarez-Kurtz (1982) la procaine inhibe la libération du calcium par le RS. Cette inhibition n'est pas due à une altération des protéines contractiles (Orentlicher et al, 1974 ; Suarez-Kurtz, 1982) mais bien due à une réelle inhibition de la libération du Ca (Lea et Ashley, 1981). Cela a été montré sur des fibres musculaires squelettiques (Chiarandini et al, 1970) et également sur des vésicules isolées de SR (Yamamoto et Kasai, 1982)

Ainsi en considérant les effets de la caféine et de la procaine, il est permis de proposer que la première composante de contraction soit due à la libération de Ca par le RS, libération

déclenchée par le courant entrant rapide selon le mécanisme de Ca-induced Ca release (Fabiato, 1983).

La première composante est insensible aux effets de l'isoprotérénol et du BAY K 8644. De même, l'acétylcholine et l'hypoxie ne modifient pas sensiblement l'amplitude de la première composante de contraction.

- Origine de la seconde composante de contraction.

La relation liant l'amplitude de la seconde composante de contraction au logarithme de la concentration externe en Ca est linéaire. On peut alors penser que la seconde composante soit due à une stimulation directe des protéines contractiles par le Ca entrant dans la cellule par les canaux calciques. Ce type de relation directe entre le courant calcique et l'amplitude de la seconde composante de contraction a été mis en évidence sur le myocarde de grenouille par Léoty et al (1970), Vassort (1971), Einwachter et al (1972), Horackova et Vassort (1976, 1979). Pour le coeur de mammifère, cette relation est plus complexe du fait de l'abondance du RS (Gibbons et Fozzard, 1971, 1975 ; New et Trautwein, 1972 ; Horackova, 1984).

Lorsque la totalité du Ca est remplacée par du Sr, la contraction est monophasique. Son amplitude est cependant plus importante qu'en présence de Ca. Cette observation peut être

rapprochée des données rapportées par Lee et al (1985) montrant que le courant entrant lent (Isi) de Sr est plus important que celui de Ca. De plus Donaldson et al (1978) et Kernick et al (1981) décrivent une efficacité identique du Sr au niveau des protéines contractiles.

La contraction monophasique obtenue en présence de Sr et en absence totale de Ca correspond probablement à la seconde composante de contraction obtenue dans les conditions de référence puisque la relation liant l'amplitude de la contraction normalisée au potentiel diastolique en milieu contenant du Sr est en tout point identique à celle obtenue en conditions de référence. Cela signifie que la disponibilité de la conductance calcique lente est identique quel que soit l'ion divalent considéré. L'inactivation de la conductance lente ne dépendrait donc que du potentiel. L'augmentation de l'amplitude de la seconde composante en présence de Sr serait vraisemblablement liée à l'augmentation du courant entrant lent (Bean 1985). En présence de Cd, qui est un inhibiteur spécifique du courant entrant lent et par conséquent de la seconde composante, la contraction est inhibée ; ce résultat renforçant l'hypothèse relative à l'absence de la première composante de contraction en milieu Sr. A la disparition de la contraction monophasique est associée une disparition du potentiel d'action. Lorsque une faible quantité de Ca (0.1 mM) est introduite dans le milieu, l'activité électrique réapparaît en même temps qu'une contraction monophasique dont le temps au pic est bref ce qui correspondrait au développement de la première composante. Il peut donc être supposé que le canal calcique rapide est imperméant aux ions Sr.

Les relations liant l'amplitude de la seconde composante de contraction à l'inversion de potentiel et à la durée du potentiel d'action mesurée à 50% de la repolarisation sont linéaires. Après une période de quiescence de 15 minutes, seule est présente la seconde composante qui est d'amplitude importante. Ces données confirment l'hypothèse selon laquelle la seconde composante de contraction correspond à une activation directe des protéines contractiles par le Ca entrant dans la cellule via les canaux calciques lents.

En présence de caféine, l'amplitude de la seconde composante de contraction augmente de façon "dose-dépendante". Cet effet inotrope positif serait lié à l'inhibition des phosphodiesterases conduisant à l'élévation de la concentration intracellulaire en AMPc qui augmente la probabilité d'ouverture des canaux calciques lents (Reuter et al (1982), Brum et al (1983), Reuter (1983), Tsien (1983)).

Par contre la procaine exerce un effet biphasique sur la seconde composante de contraction (augmentation de l'amplitude aux faibles concentrations, diminution de l'amplitude aux fortes concentrations). L'effet inotrope positif observé aux faibles concentrations de procaine serait dû selon Kurihara (1975), Kurihara et Sakai (1976), Casteels et al (1977) à une diminution de la conductance potassique qui aurait pour conséquence de retarder la repolarisation membranaire et de ce fait permettrait un influx calcique de durée plus importante. L'effet inotrope négatif observé à forte concentration serait dû selon Jacobs et Keatinge (1974), Casteels et al (1974), Kurihara et Sakai (1976) à une diminution de la conductance calcique.

La seconde composante de contraction apparaît être la seule sensible aux effets de l'isoprotérénol et du BAY K 8644 aux concentrations utilisées dans ce travail. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bean (1985) et de Nilius et al (1985) qui montrent que seul le canal calcique lent est sensible à ces deux substances. L'accroissement de l'amplitude du courant entrant lent se traduit donc par l'augmentation de l'amplitude de la seconde composante de contraction. Cet effet stimulant de l'isoprotérénol sur le courant entrant lent serait dû à la phosphorylation des canaux calciques par les protéines kinases activées par l'AMPC (Vassort et al, 1969 ; Tsien, 1973 ; Reuter, 1974 ; Niedergerke et Page, 1977 ; Reuter et Scholz, 1977 ; Nargeot et al, 1983). Les récents travaux réalisés en "patch clamp" mettent en évidence que la phosphorylation des protéines intramembranaires augmente la probabilité d'ouverture des canaux (Reuter et al, 1982 ; Brum et al, 1983 ; Reuter, 1983 ; Tsien, 1983). Cependant Bean (1984) rapporte que cet effet serait lié à une augmentation de la conductance élémentaire du canal calcique lent ainsi qu'à une altération des cinétiques d'activation et d'inactivation. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPC est consécutive à la stimulation des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques qui activent une protéine G (dépendante du GMP, Berridge, 1985) elle même activant une lipoprotéine, l'adényl-cyclase (Sutherland et al, 1962 ; Reuter, 1974 ; Engelhad et al, 1976) qui assure donc la conversion d'ATP en AMPC. Egalement les protéines kinases activées par l'AMPC phosphorylent les phospholambanes du RS. De ce fait, les agonistes des récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques produisent donc un effet relaxant puissant en stimulant la reprise de Ca par le RS comme le montrent Morad et Rolett (1972), Katz (1973), Tada et al (1975), Mattiazi et Cingolani (1981), Fabiato (1981), Brum et al (1983) (fig 67).



Le BAY K 8644 augmente spécifiquement l'amplitude du courant entrant lent et de ce fait peut aussi moduler l'amplitude de la seconde composante de contraction (Schramme et al, 1983 ; Brown et al, 1984 ; Renaud et al, 1984 ; Hess et al, 1985 ; Thomas et al, 1985). Le BAY K 8644 augmente la probabilité de trouver les canaux dans un état de longue durée d'ouverture et de brève durée de fermeture (Kokubun et Reuter, 1984 ; Sanguinetti et Kass, 1984 ; Brown et al, 1984 ; Hess et al, 1985 ; Thomas et al, 1985).

En présence d'acétylcholine la seconde composante de contraction est inhibée de façon spécifique. Prokopczuk et al (1973), Giles et Tsien (1975), Kemoto et Goto (1975), Garnier et al (1976), Ten Eick et al (1976), Nargeot et al (1981) proposent que l'acétylcholine diminue directement le courant entrant lent (Isi). Cette diminution serait due à une réduction de la conductance maximale (Nargeot, 1981). Le GMPc ne serait pas impliqué comme second messager de l'acétylcholine (Imbrid et Lefkowitz, 1975 ; Nawrath, 1977 ; Trautwein et al, 1982 ; Brum et al, 1983 ; Nargeot et al, 1983) puisque l'effet inotrope négatif ne semble pas être relié à la concentration intracellulaire du GMPc (Brooker, 1973 ; Mirro et al, 1979). Selon Berridge (1985), la stimulation des récepteurs muscariniques conduirait à une diminution de la concentration intracellulaire en AMPc. En effet l'activation d'une protéine membranaire dépendante du GTP par le récepteur muscarinique inhiberait l'activité de l'adénylcyclase. L'acétylcholine dans ces conditions, provoquerait une diminution de la phosphorylation des

canaux lents et par conséquent une diminution de l'amplitude de la seconde composante de contraction (fig 67). De plus, l'acétylcholine est bien connue pour activer un courant sortant potassique s'écoulant au travers du canal de rectification de sens entrant (Garnier et al, 1976 ; Ojeda et al, 1969 ; Mubagwa, 1983 ; Momose, 1984). Cependant les études réalisées en "patch clamp" infirment cette hypothèse et montrent que le canal impliqué possède des propriétés différentes de celles du canal de rectification de sens entrant. Ainsi, l'acétylcholine en réduisant la conductance calcique lente et en activant un courant sortant de K réduirait donc l'amplitude de la seconde composante de contraction.

L'hypoxie a un effet inhibiteur immédiat et spécifique sur la seconde composante de contraction. Hearse (1979) propose que l'hypoxie conduisant à une diminution du stock intracellulaire en ATP provoquerait de ce fait une diminution de la concentration intracellulaire en AMPc. Cela conforte encore l'hypothèse selon laquelle les canaux calciques lents sont très sensibles au taux d'AMPc (Bean, 1985 ; Nilius et al, 1985).

- Interrelation des deux composantes de contraction.

Dans les conditions de référence, la durée du PA est fortement augmentée par les ions TEA et un effet inotrope positif apparaît sur la première composante de contraction. Ces observations sont en accord

avec les résultats de Fabiato (1985). Cet auteur démontre que le Ca entrant dans la cellule par les canaux lents est recyclé dans le RS et peut être utilisé durant la systole suivante dans le déclenchement de la première composante. Ainsi, la régulation de l'amplitude de la première composante peut être réalisée indirectement par le contrôle de l'amplitude du courant entrant lent qui conditionne lui-même l'amplitude de la seconde composante de contraction. La diminution de l'amplitude de la seconde composante de contraction sous l'influence du TEA serait liée à l'accroissement de la  $pCa_i$  provoquée par l'importante libération de Ca du RS déclenchée par le courant calcique rapide.

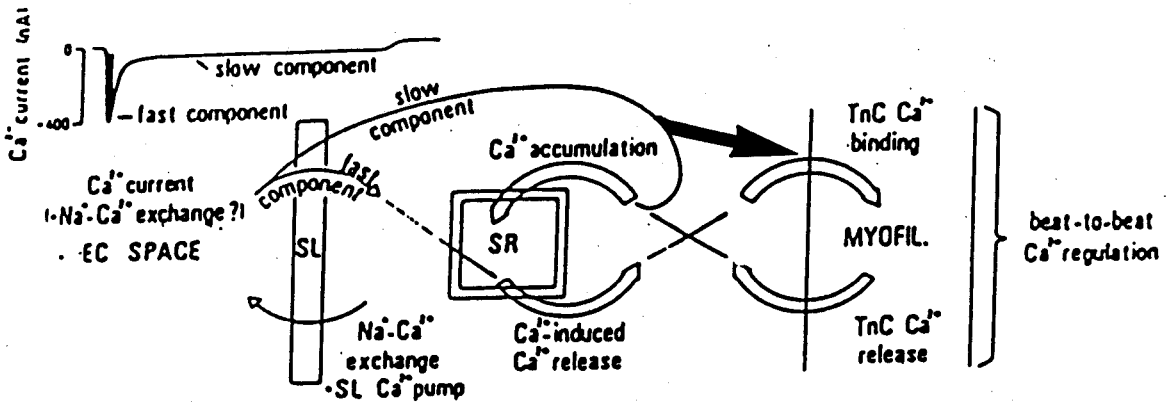
- Relations entre l'ultrastructure et le décours de la contraction.

Comme la contraction biphasique apparaît être due d'une part à une libération de Ca par le RS et d'autre part à une stimulation directe des protéines contractiles par le Ca entrant dans la cellule via les canaux lents, il semblait intéressant de vérifier cette hypothèse en analysant dans nos conditions de référence la contraction de préparations plus ou moins riches en RS et dont le potentiel d'action présente un plateau de dépolarisation plus ou moins marqué.

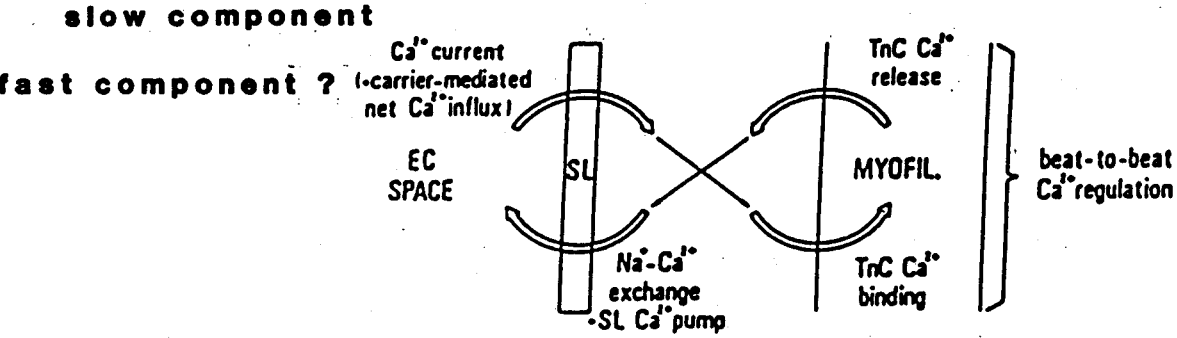
Le muscle papillaire de rat, en conditions de référence, présente une contraction monophasique correspondant à la première composante de contraction étant donné d'une part son temps au pic de contraction et d'autre part son inhibition par la caféine. De plus, le

potentiel d'action de cette préparation présente un aspect triangulaire qui témoigne, en accord avec les travaux de Mitchell (1983) et de Stephenson (1984) de l'absence de courant entrant calcique lent. Cette donnée explique l'absence de seconde composante de contraction en milieu hyperpotassique et en présence d'isoprotérénol du muscle papillaire de rat.

Dans les conditions de référence, la contraction de l'oreillette de cobaye est monophasique. Comme le potentiel d'action présente un aspect triangulaire, il est permis de penser que le courant entrant lent n'existe pas comme dans le muscle papillaire de rat et donc que la seconde composante de contraction soit inexistante. En effet, nos résultats montrent que même en présence d'un allongement du potentiel d'action induit par le TEA (60 mM), la contraction reste monophasique. De plus, lorsque le Ca est totalement remplacé par le Sr, les activités électrique et mécanique disparaissent. Ces données confortent les hypothèses d'une part selon lesquelles le Sr ne passerait pas par le canal calcique rapide et que d'autre part les canaux calciques lents ne seraient pas présents dans cette structure. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Gettes et Reuter (1974), Beeler et Reuter (1977), Reuter et Scholz (1977), Mc Donald et Trautwein (1978), Noma et al (1980) démontrant l'absence de courant entrant lent au niveau des cellules des noeuds sino auriculaire et auriculo ventriculaire.



frog ventricle



rat ventricle

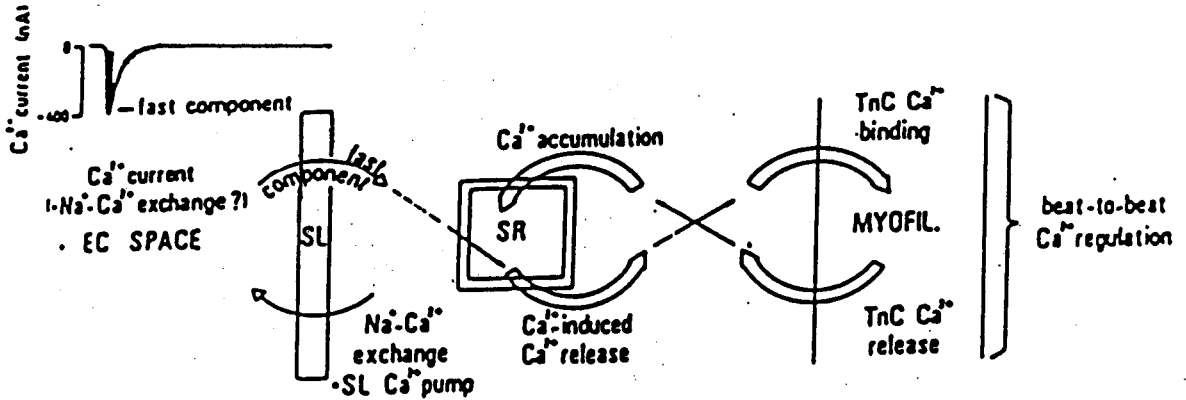


Fig 66 :

Schéma résumant les différentes étapes du couplage excitation contraction des différents types de cellules cardiaques. Modifié d'après Fabiato (1983).

La contraction du myocarde de grenouille est monophasique dans les conditions de référence. La caféine ne modifie pas ou peu cette contraction monophasique qui semble de ce fait correspondre à la seconde composante de contraction enregistrée au niveau du muscle papillaire de cobaye. L'absence de la première composante de contraction peut être reliée à l'extrême pauvreté du myocarde de grenouille en RS (Niedergerke et Page, 1963 ; Page et al, 1971 ; Page, 1978). Cependant, la caféine exerce un léger effet inotrope négatif (10%) en accord avec les travaux de Chapman et Miller (1974) montrant que le RS pourrait jouer un rôle dans le déclenchement de la contraction du myocarde de grenouille. Cet effet de la caféine sur le RS contrebalancerait l'effet inhibiteur des phosphodiesterases qui conduit normalement à l'augmentation de l'amplitude de la contraction. La contraction des cellules myocardiques de grenouille en conditions de référence serait donc principalement due à une stimulation directe des protéines contractiles par le Ca entrant dans la cellule par les canaux calciques lents.

En conclusion, le myocarde de cobaye serait donc une structure intermédiaire entre celui de rat et celui de grenouille puisque les cellules myocardiques de cobaye possèdent les deux types de canaux et un RS bien développé pouvant ainsi rendre compte de la contraction biphasique (fig 66 et 67).

A l'appui de ces résultats, des travaux récents réalisés sur le muscle squelettique montrent l'existence d'une contraction biphasique (Ildefonse et al, 1985) probablement liée à deux influx de Ca correspondant à deux populations de canaux calciques (Cota et Stéfani,

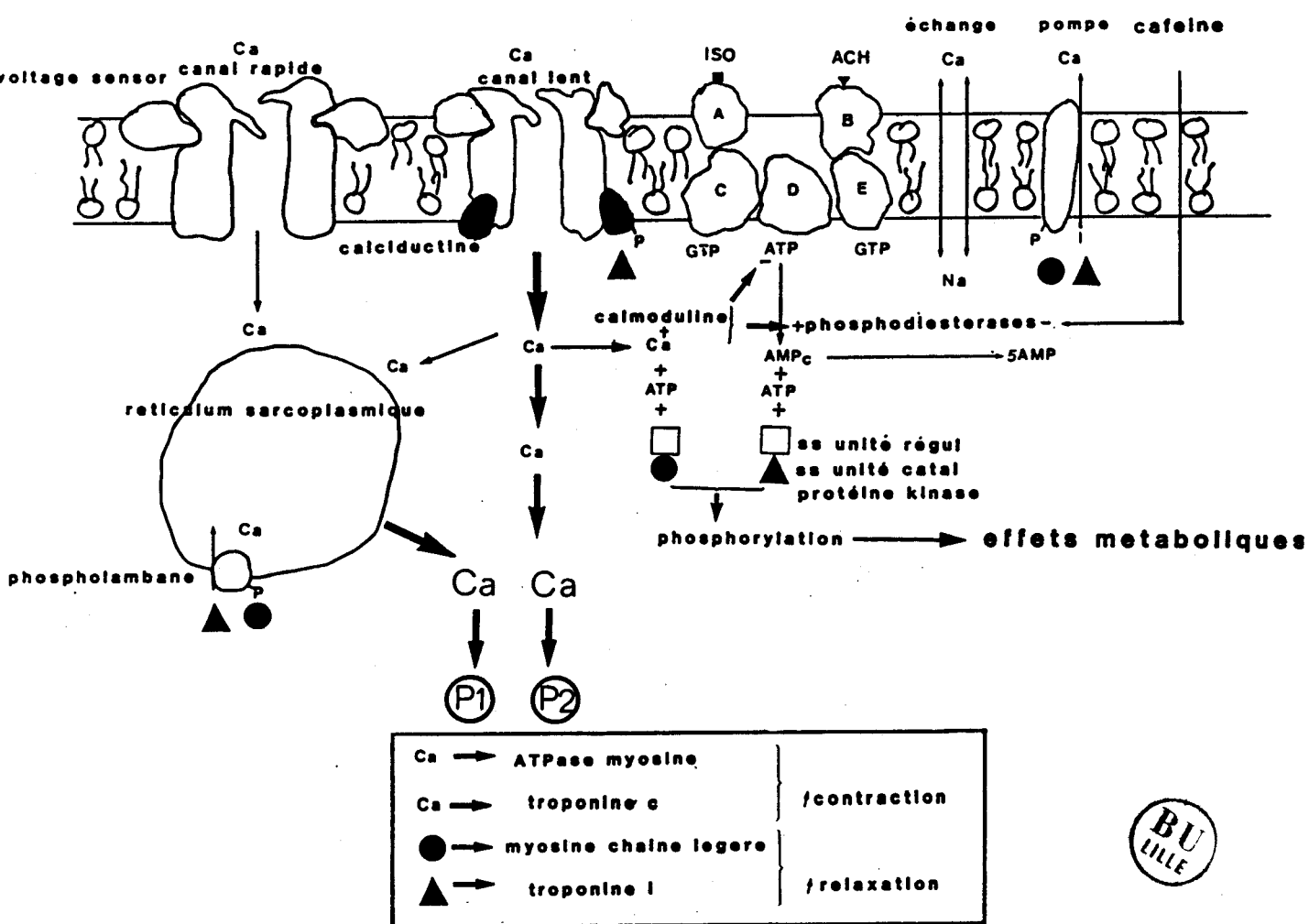


Fig 67 :

Schéma récapitulatif des différentes étapes de la régulation de la contraction des cellules myocardiques ventriculaires de cobaye.

- A : récepteur adrénérgique
- B : récepteur muscarinique
- C : protéine G activatrice
- D : adényl cyclase
- E : protéine G inhibitrice.

1986). La contraction biphasique apparaît donc être une propriété générale des cellules musculaires possédant du RS et les deux types de canaux calciques.



## RESUME ET CONCLUSION GENERALE.

En l'absence du mécanisme d'échange Na-Ca, il peut être enregistré au niveau de certaines préparations cardiaques une contraction biphasique.

La première composante de contraction est liée à la libération de Ca par le réticulum sarcoplasmique déclenchée par le courant entrant calcique rapide.

La seconde composante de contraction est liée à l'activation directe des protéines contractiles par le calcium transporté par le courant entrant lent.

Seuls les canaux calciques lents sont sensibles aux diverses substances telles que l'isoprotérénol, l'acétylcholine et les dihydropyridines.

Les effets particuliers des ions Sr lorsqu'ils substituent les ions Ca en totalité tendent bien à montrer que le canal calcique rapide est plus spécifique aux ions Ca que ne l'est le canal calcique lent.

La contraction des cellules cardiaques pourrait de ce fait correspondre à trois composantes :

- deux composantes phasiques liées aux deux courants entrants de Ca
- une composante tonique liée à l'influx de Ca produit par l'activation du mécanisme d'échange Na-Ca.

ALLEN, D.G., JEWELL, B.R. and WOOD, E.H. (1976).

Studies of the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation. *J. Physiol.* 254, 1-17.

ARLOCK, P. and KATZUNG, B.G. (1982).

Effects of sodium substitutes on ouabain induced transient inward current. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 25, 57-60.

ARMSTRONG, C.M. and MATTESSON, D.R. (1985).

Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science.* 277, 65-67.

ASHCROFT, F.M. and STANFIELD P.R. (1981).

Calcium dependence of the inactivation of calcium currents in skeletal muscle fibers of an insect. *Science.* 213, 224-226.

ASHCROFT, F.M. and STANFIELD P.R. (1982).

Calcium inactivation in skeletal muscle fibers of the stick insect. *J. Physiol.* 330, 349-372.

ATTWELL, D. and COHEN, I. (1971).

The voltage clamp of multicellular preparations. *Prog. Diophys. Mol. Biol.* 31, 201-245.

BASSINGHTWAIGHTE, J.B. and REUTER H. (1972). Calcium movements and excitation contraction coupling in cardiac cells. In : Electrical phenomena in the heart (W.C. de Mello ed.) New York, Academic Press.

BASSINGHTWAIGHTE, I.B., FRY, C.H. and MCGUIGAN, J.A.S. (1975). Relationship between internal calcium and outward current in mammalian ventricular muscle ; a mechanism for the control of the action potential duration ? J. Physiol. 262, 15-37.

BEAN, B., NOWYCKY, M.C. and TSIEN R.W. (1984). Beta adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells. Nature. 307, 371-375.

BEAN, B. (1985). Two kinds of Ca channels in canine atrial cells. J. Gen. Physiol. 86, 1-30.

BEELEER, G.W. and REUTER H. (1970). Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. J. Physiol. 207, 165-190.

BELLER, G.W. and REUTER H. (1970). The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibres. J. Physiol. 207, 211-229.

BELLER, G.W. and REUTER H. (1977).

Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* 207, 165-209.

BERESEWICZ, A. and REUTER H. (1977).

The effects of adrenaline and theophylline on action potential and contraction of mammalian ventricular muscle under "rested-state" and "steady-state" stimulation. *Arch. Pharmacol.* 301, 99-107.

BERRIDGE, M. (1985).

Les molécules de la communication dans la cellule. *Scientific American.* 98, 134-148.

BERS, D.M. (1985).

Effect of caffeine on cardiac cells. *Am. J. Physiol.* 248, H366-H381.

BLINKS, J.R. and KOCH-WESER C.J. (1961).

Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 134, 373-389.

BLINKS, J.R., OLSON, C.B., JEWELL B.R. and BRAVENY P. (1972).

Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart muscle. *Circ. Res.* 30, 367-392.

BOGDANOV, Y.K., ZAKHAROV, S.I. and ROSENSHRAUKH, L.V. (1978).

The origin of two components in contraction in guinea pig papillary muscle in the presence of noradrenaline. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.* 57, 866-872.

BONVALLET, R., CHRISTE, G., ILDEFONSE M. and ROUGIER O. (1985).

Possible role of Na ions in intracellular Ca release in frog auricular trabeculae. *Gen. Physiol. Biophys.* 4, 167-183.

BRAVENY, P. and SUMBERA, J. (1972).

Biphasic activation of myocardial contraction. *Physiol. Bohemoslav.* 21, 73-74.

BROOKER, G. (1973).

Change in myocardial adenosine 3,5 cyclic monophosphate during the contraction cycle. In : *Recent advance in studies on cardiac structure and metabolism Vol 3*, Baltimore : University Park Press, 207-212.

BROWN, H.F., KIMURA, J. and NOBLE, S.J. (1982).

The relative contributions of various time dependant membrane currents to pacemaker activity in the sino-atrial node. In : *Cardiac rate and rythm*, ed. BOUMAN, L.N. and JONGSMA H.J. pp. 53-68. Martinus Nighoff : the Hague.

BROWN, H.F., KIMURA, J., NOBLE, D., NOBLE, S.J. and TAUPIGNON, A. (1985).

Two components of second inward current in the rabbit S.A node. *J. Physiol.* 334, 56-57 P.

BROWN, H.F., NOBLE, D., NOBLE, S. and TAUPIGNON, A. (1984).

Transient inward current and its relation to the very slow inward current in S.A node. *J. Physiol.* 349, 47 P.

BROWN, H.F., KIMURA, J., NOBLE, D., NOBLE, S., and TAUPIGNON A. (1984).

The slow inward current  $I_{si}$  in the rabbit S.A node investigated by voltage clamp and computer simulation. *Proc. R. Soc. B.* 217, 203-214.

BRUM, G., FLOCKERZI, V., HOFMANN, F. and OSTERRIEDER, W. (1983).

Injection of the catalytic subunit of c AMP-dependant proptein-kinase into isolated cardiac myocytes. *Pflugers Archv.* 398, 147-154.

BUTCHER, R.W., and SUTHERLAND, E.W. (1962).

Adenosine 3,5 phosphate in biological materials : Purification and properties of cyclic 3,5 nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3, 5 phosphate in human urine. *J. Biol. Chem.* 237, 1244-1250.

CAPUTO, C. (1976).

The effects of caffeine and tetracaine on the time course of potassium contractions of single muscle fibers. *J. Physiol.* 255, 191-207.

CAPUTO, C. and DIPOLO R. (1978).

Contractile activation phenomena in voltage clamped muscle fiber. *J. Gen. Physiol.* 71, 461-488.

CARBONE, E. and LUX, H.D. (1984).

A low voltage activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature (Lond)*. 310, 501-502.

CASTEELS, R., KITAMURA, H., KURIYAMA, H. and SUZUZI, H. (1977).

The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol.* 271, 41-61.

CAVALIE, A., OCHI, R., PELZER, D. and TRAUTWEIN, W. (1983).

Elementary currents through Ca channels in guinea pig myocytes. *Pflugers Arch.* 398, 284-297.

CHAPMAN, R.A. and MILLER, D.J. (1974).

Caffeine and the heart. *J. Physiol.* 242, 589-613.

CHESNOIS MARCHAIS, D. (1985).

Kinetic properties and selectivity of calcium permeable single channels in *Aplysia* neurones. *J. Physiol.* 367, 457-488.

CHIARANDINI, D.J., REUBEN, J.P., BRANDT P.W. and GRUNDFEST, H. (1970).

Effects of caffeine on Crayfish muscle fibers. Activation of contraction and induction of Ca spike electrogenesis. *J. Gen. Physiol.* 55, 640-664.

CORABOEUF, E. (1975).

Membrane electrical activity and double component contraction in cardiac tissue. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 6, 215-225.

CORABOEUF, E., GAUTIER, P. and GUIRAUDOU, P. (1981).

Potential and tension changes induced by sodium removal in dog Purkinje fibers : role of an electrogenic Na-Ca exchange. *J. Physiol.* 311, 605-622.

COTA, G and STEFANI, E. (1986).

A fast activated inward Ca current in twitch muscle fibers of the frog (*Rana Montezume*). *J. Physiol.* 370, 151-163.

DEITMER, J.W. (1984).

Evidence for two voltage dependent calcium currents in the membrane of the Ciliate *Stylonychia*. *J. Physiol.* 355, 137-159.

DI FRANCESCO, D., HART, G. and NOBLE, D. (1983).

Demonstration of oscillatory variations in  $(Ca)_i$  and membrane currents in a computer model of Ca-induced Ca release in mammalian Purkinje fibre and ventricular muscle. *J. Physiol.* 334, 8-9 P.

DONALDSON, S.K.B., BEST, P.M. and KERRICK, W.G.L. (1978).

Characterization of the effects of Mg on Ca and Sr activated tension generation of skinned rat cardiac fibers. *J. Gen. Physiol.* 71, 645-655.



ECKERT, R. and SHAD, J.E. (1984).

Inactivation of Ca channels. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 44, 215-267.

ECKERT, R. and TILLOTSON, D. (1981).

Calcium mediated inactivation of the calcium conductance in Cs loaded giant neurones of *Aplysia Californica*. *J. Physiol.* 314, 265-280.

EINWACHTER, H.M., HASS, H.G. and KERN, R. (1972).

Membrane current and contraction in frog atrial fibers. *J. Physiol.* 227, 141-171.

EISNER, D.A., LEDERER, W.J. and NOBLE, D. (1979).

Caffeine and tetracaine abolish the slow inward current in sheep cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.* 293, 76 P.

EISNER, D.A., LEDERER, W.J. and WAUGHAN-JONES, R.D. (1983).

The control of tonic tension by membrane potential and intracellular Na activity *J. Physiol.* 335, 723-743.

ENDO, M., TAKANA, M. and OGAWA, Y. (1970).

Calcium induced release of calcium from sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal fibres. *Nature.* 228, 34-36.

ENGELHARDT, V.H., PLUT, D.A. and STORM, D.R. (1976).

Subcellular location of adenylate cyclase in rat cardiac muscle.  
Biochem. Biophys. Acta. 451, 48-61.

ENGLAND, P.J. (1975).

Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. FEBS Letters. 50, 57-60.

FABIATO, A. and FABIATO, F. (1979).

Calcium and cardiac excitation contraction coupling. Annu. Rev. Physiol. 41, 473-484.

FABIATO, A. (1981).

Mechanism of calcium induced calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells studied with potential sensitive dyes.

In : The mechanism of gated calcium transport across biological membranes by S.T Ohnishi. and M. Endo. Acad. Press.

FABIATO, A. (1982).

Calcium release in skinned cardiac cells : variations with species, tissues and development. Federation Proc. 41, 2238-2244.

FABIATO, A. (1983).

Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol. 245, C1-C14.

FABIATO, A. (1985).

Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* 85, 291-320.

FEDULOVA, S.A., KOSTYUK, P.G. and VESELOVSKYN, N.S. (1985).

Two types of calcium channels in the somatic membrane of newborn rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 359, 431-446.

FOX, A.P. and KRASNE, S. (1984).

Two calcium currents in Neantles *Arenaceodontatus* egg cell membranes. *J. Physiol.* 356, 491-505.

FOZZARD, H.A. and WASSERSTROM, J.A. (1985)

Voltage dependence of intracellular sodium and control of contraction. In cardiac electrophysiology and arrhythmias edited by D.P. ZIPES.

GARNIER, D. and ROUGIER, O. (1969).

Action de l'acétylcholine et du chlorure de tétraéthylammonium sur les courants transmembranaires des cellules myocardiques. Dans : *Médicaments du myocarde et du muscle strié*. Ed. Nancy, Lamarche, M. et Royer. P., 333-344.

GARNIER, D., GOUPIL, N., NARGEOT, J. and OJEDA, C. (1976).

Etude en voltage imposé de l'action inotrope de l'acétylcholine sur la fibre myocardique. *J. Physiol. Paris.* 72, 87.

GARNIER, D., NARGEOT, J., OJEDA, C. and ROUGIER O. (1978).

The action of acetylcholine on the background conductance in frog atrial trabeculae. *J. Physiol.* 274, 381-396.

GETTES, L.S. and REUTER H. (1974).

Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J. Physiol.* 240, 703-724.

GIBBONS, W.R. and FOZZARD, H.A. (1971).

Voltage dependance and time dependance of contraction in sheep cardiac Purkinje fibres. *Cir. Res.* 28, 446-460.

GIBBONS, W.R. and FOZZARD, H.A. (1975).

Relationship between voltage and tension in sheep cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Physiol.* 65, 345-365.

GIBBONS, W.R. and FOZZARD, H.A. (1975).

Slow inward current and contraction of sheep cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Physiol.* 65, 367-384.

GILES, W. and TSIEN, R.W. (1975).

Effects of acetylcholine on membrane currents in frog atrial muscle. *J. Physiol.* 246, 64-66.

GLITSH, H., REUTER, H. and SCHOLZ, H. (1970)

The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles. *J. Physiol.* 209, 25-43.

GOTO, M., YATANI, A. and EHARA, T. (1979).

Interaction between caffeine and adenosine on the membrane current and tension component in the bullfrog atrial muscle. *Jap. J. Physiol.* 29, 393-409.

HAGIWARA, S., OZAWA, S. and SAND, O. (1975).

Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 65, 617-644.

HARRISSON, S.M. and MILLER, D.J. (1985).

Sodium induced calcium release in chemically skinned rat cardiac fibres. *J. Physiol.* 359, 79 P.

HEARSE, D.J. (1979)

Oxygen deprivation and early myocardial contractile failure. A reassessment of the possible role of adenosine triphosphate. *Am. J. Cardiol.* 44, 1115-1121.

HENNINGS, B. and VERECKE, J. (1983).

Effects of Cs and Ba on the transient inward current of sheep cardiac purkinje fibers. *J. Physiol.* 345, 149P.

HERZ, R. and WEBER, A. (1965).

Caffeine inhibitor of Ca uptake by muscle reticulum. Fed. Proc. 24, 208.

HESS, P., LANSMAN, J.B. and TSIEN, R.W. (1984).

Different modes of Ca channels gating behaviour favoured by dihydropyridines Ca agonists and antagonists. Nature. 311, 538-544.

HONERJAGER, P. and REITER, M. (1975).

The relation between the effects of veratridine on action potential and contraction in mammalian ventricular myocardium. Naunyn Schmiedeberg Archiv. 289, 1-28.

HONORE, E. and CHALLICE, C.E. (1985).

The origin of two components of contraction in guinea pig papillary muscle. I.R.C.S. - Med. Sci. 13, 707-708.

HONORE, E. and CHALLICE, C.E. (1986).

The two components of contraction in guinea pig papillary muscle : A study using a potassium rich solution with isoproterenol. International Congress of the American Association for Heart Research (Houston, 1985). J. Moll. Cell. Cardiol. In press.

HONORE, E., CHALLICE, C.E., GUILBAULT, P. and DUPUIS, B. (1986).

Two components of contraction in guinea pig papillary muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol. In Press.

HONORE, E., ADAMANTIDIS, M., CHALLICE, C.E., DUPUIS, B., GUILBAULT, P.  
(1986).

Ca channels and excitation contraction coupling in cardiac cells.

I) Two components of contraction in relation with two Ca currents in guinea pig papillary muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol. submitted.

HONORE, E., ADAMANTIDIS, M., CHALLICE, C.E., DUPUIS, B., GUILBAULT, P.  
(1986).

Ca channels and excitation contraction coupling in cardiac cells.

II) Pharmacological study of the biphasic contraction. Can. J. Physiol. Pharmacol. Submitted

HONORE, E. and ADAMANTIDIS, M. (1986).

Comparative study of the effects of digitalis and new aminosteroides on the biphasic contraction. Brit. J. Pharmacol. Submitted

HORACKOVA, M. and VASSORT, G. (1973).

Ionic mechanism of inotropic effect of veratridine on frog heart. Pflugers. Arch. 341, 281-284.

HORACKOVA, M. and VASSORT, G. (1974).

Excitation contraction coupling in frog heart , effect of veratridine. Pflugers. Arch. 352, 291-302.

HORACKOVA, M. and VASSORT, G. (1976).

Regulation of tonic tension in frog atrial muscle by voltage dependant Na-Ca exchange. J. Physiol. 258, 77-78 P.

HORACKOVA, M. and VASSORT, G. (1978)

Na-Ca exchange in regulation of cardiac contraction. *Recent. Adv. Stud. Card. Struct. Metab.* 11, 137-141.

HORACKOVA, M. and VASSORT, G. (1979).

Sodium-calcium exchange in regulation of cardiac contractility : evidence for an electrogenic, voltage dependant mechanism. *J. Gen. Physiol.* 73, 403-424.

HORACKOVA, M. (1984).

Transmembrane calcium transport and the activation of cardiac contraction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62, 874-883.

HUME, J.R. and GILES, W. (1981).

Active and passive electrical properties of single bullfrog atrial cells. *J. Gen. Physiol.* 78, 18-43.

HUME, J.R. and GILES, W.R. (1983).

Ionic currents in single isolated bulfrog atrial cells. *J. Gen. Physiol.* 81, 153-194.

IKEMOTO, Y. and GOTO, M. (1975).

Nature of the negative inotropic effect of acetylcholine on the myocardium , an elucidation on the bulfrog atrium. *Proc. Jap. Acad.* 51, 501-505.



ILDEFONSE, M ; JACQUEMOND, V ; ROUGIER, O ; RENAUD, J. F ; FOSSET, M and LAZDUNSKI, M. (1985)

Excitation contraction coupling in skeletal muscle : evidence for a role of slow Ca channel activators and inhibitors in the dihydropyridines series. *Biochem and Biophys communications.* 129, 904-909.

ILINAS, R. and YAROM, Y. (1981a).

Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage dependant ionic conductances. *J. Physiol.* 315, 549-567.

ILINAS, R and YAROM, Y. (1981b).

Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsivness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J. Physiol.* 315, 569-584.

ISENBERG, G. (1976).

Cardiac Purkinje fibers : Cesium as a tool to block inward rectifying potassium currents. *Pflugers Arch.* 365, 99-106.

ISENBERG, G. (1977).

Cardiac Purkinje fibres (Ca)<sup>2+</sup> controls the potassium permeability via the conductance components GK1 and GK2. *Pfugers Arch.* 371, 77-85.

ISENBERG, G. and KLOCKNER, U. (1980).

Glycocalyx is not required for slow inward calcium current in isolated rat heart myocytes. *Nature. Lond.* 284, 358-360.

ISENBERG, G. and KLOCKNER, U. (1982).

Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflugers Arch.* 395, 30-41.

JACOBS, A. and KEATINGE, W.R. (1974).

Effect of procaine and lignocaine on electrical and mechanical activity of smooth muscle of sheep carotid arteries. *Br. J. Pharmacol.* 31, 405-411.

JDAIAA, H. and GUILBAULT, P. (1986).

Is inward calcium current in Crayfish muscle membrane constituted of one or two components ? *Gen. Physiol. Biophys.* 5, 3-16.

JOSEPHSON, I.R., SANCHEZ-CHAPULA, J. and BROWN, A.M. (1984).

A comparison of Ca currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circ. Res.* 54, 144-156.

KAO, R.C., CHRISTMANE, E.W., LUH, S.L., KRAUHS, J.M., PYERS, G.F.O. and WILLIAMS E.H. (1980).

The effects of insulin and anoxia on the metabolism of isolated mature rat cardiac myocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 587-599.

KARAGUEZIN, H.S. and KATZUNG, B.G. (1982).

Voltage clamp studies of transient inward current and mechanical oscillations induced by ouabain in ferret papillary muscle. *J. Physiol.* 327, 255-271.

KASS, R.S. and TSIEN, R.W. (1976).

Control of action potential duration by calcium ions in cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol.* 67, 599-617.

KATZ, A.M., COLVIN, R.A. and ASHAVID, J. (1983).

Phospholamban and calmodulin. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 15, 795-797.

KERRICK, W.G.L., MALENCIK, P.A., HOAR, P.E., POTTER, J.D., COBY, R.L., POCINNONG, S. and FISHER, E.H. (1980).

Ca and Sr activation : Comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflugers Arch.* 386, 207-213.

KING, B.W. and BOSE, D. (1983).

Mechanism of biphasic contractions in strontium treated ventricular muscle. *Circ. Res.* 52, 65-75.

KOKUBUN, S. and IRISAWA, H. (1984).

Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium current of guinea pig single ventricular cells. *Jap. J. Physiol.* 34, 599-611.

KOKUBUN, S. and REUTER, H. (1984).

Dihydropyridines derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4824-4827.

KURIHARA, S. (1975).

The effect of procaine on the mechanical and electrical activities of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder. *Jpn. J. Physiol.* 25, 775-788.

KURIHARA, S. and SAKAI, T. (1976).

Relationship between effects of procaine and Ca on spontaneous electrical and mechanical activities of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder. *Jpn. J. Physiol.* 26, 487-501.

LANGER, G.A., SERENA, S.D. and NUDD, L.M. (1974).

Cation exchange in heart cell culture : correlation with effects on contractile force. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 6, 149-161.

LANGER, G.A. (1976).

Events at the cardiac sarcolemma : localization and movement of contractile dependant calcium. *Fed. Proc.* 35, 1274-1278.

LEA, T.J. and ASHLEY, C.C. (1981).

Carbon dioxide or bicarbonate ions release Ca from internal stores in crustacean myofibrillar bundles. *J. Memb. Biol.* 62, 115-125.

LEDERER, W.J. and TSIEN, R.W. (1976).

Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres. *J. Physiol.* 263, 73-100.

LEE, K.S. and TSIEN, R.W. (1982).

Reversal of current through Ca channels in dialysed single heart cells. Nature Lond. 297, 498-501.

LEE, K.S. and TSIEN, R.W. (1983).

Mechanism of Ca channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. Nature Lond. 302, 790-794.

LEE, K.S. and TSIEN, R.W. (1984).

The selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea pig. J. Physiol. 354, 253-272.

LEE, E., LEE, K.S., NOBLE, D. and SPINDLER, A.J. (1984a).

A new very slow inward Ca current in single ventricular cells of adult guinea pig. J. Physiol. 349, 48P.

LEE, E., LEE, K.S. and SPINDLER, A.J. (1984b).

Further properties of the very slow inward currents in isolated single guinea pig ventricular cells J. Physiol. 349, 48P.

LEE, K.S., NOBLE, D., LEE, F.R.S.E. and SPINDLER, J. (1984).

A new calcium current underlying the plateau of the cardiac action potential. Proc. R. Soc. Lond. B223, 35-48.

LEE, K.S., NOBLE, D., LEE, F.R.S.E. and SPINDLER, J. (1984).

A new calcium current underlying the plateau of the cardiac action potential. Proc. R. Soc. Lond. B223, 35-48.

LEOTY, C., RAYMOND, G. and GARGOUIL, Y.M. (1970).

Tensions phasique et tonique de la fibre myocardique de grenouille et les courants ioniques transmembranaires ; étude en voltage imposé et par microphotométrie. Acad. Sci. Ser. D. 271, 1545-1548.

LEOTY, C. and RAYMOND, G. (1972).

Mechanical activity and ionic currents in frog atrial trabeculae. Pflugers Archiv. 334, 114-128.

LIMBRID, L.E. and LEFKOWITZ, R.J. (1975)

Myocardial guanylate cyclase : properties of the enzyme and effects of cholinergic agonists in vitro. Biochem. Biophys. Acta, 377, 186-196.

Mc DONALD, T.F. and TRAUTWEIN, W. (1978).

The potassium current underlying delayed rectification in cat ventricular muscle. J. Physiol. 274, 217-246.

Mc DONALD, T.F. (1982).

The slow inward calcium current in the heart. Ann. Rev. Physiol. 44, 425-434.

Mc GUIGAN, J.A.S. (1968).

Tension in ventricular fibers during a voltage clamp. Helv. Physiol. 26, 262-263.

MALECOT, C.O., BERS, D.M. and KATZUNG, B..G. (1984).

Biphasic contractions induced by Milrinone in Ferret cardiac muscle.  
Circ. 70, 168(a).

MARBAN, E. and TSIEN, R.W. (1982).

Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart : positive feed-back regulation by intracellular calcium ? J. Physiol. 329, 589-614.

MATTESON, D.R. and ARMSTRONG, C.M. (1984).

Evidence for two types of Ca channels in GH3 cells. Biophys. J. 45, 36a.

MATTEIAZI, A.R. and CINGOLANI, M.E. (1981).

Positive inotropic and relaxant effects of papaverine on cat papillary muscle. Arch. Int. Physiol. Biochem. 89, 167-174.

MIRRO, M.J., BAILEY, J.C. and WATANABE, A.M. (1979).

Dissociation between the electrophysiological properties and total tissue cyclic guanosine monophosphate content of guinea pig atria. Circ. Res. 45, 225-233.

MITCHELL, M.R., POWELL, T. TERRAR, D.A. and TWIST, V.W. (1983).

Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. Proc. R. Soc. B219, 447-469.

MITCHELL, M.R., POWELL, T., TERRAR, D.A. and TWIST, V.W. (1983).

Membrane potential and contraction in voltage clamped cells from rat and guinea pig ventricular muscle. Proc. Physiol. Soc. 77p, 125.

MOMOSE, Y., GILES, W. and SZABO, G. (1984).

Acetylcholine-induced K current in amphibian atrial cells. Biophys. J. 45, 20-22.

MORAD, M. and ROLETT, E.L. (1972).

Relaxing effects of catecholamines on mammalian heart. J. Physiol. 224, 537-558.

MORAD, M. and TRAUTWEIN, W. (1968).

The effect of duration of the action potential on contraction in the mammalian heart tissue. Pflugers Arch. 299, 66-82.

MUBAGWA, K., VEREEKE, J. and CARMELIET, E. (1983).

Does the acetylcholine induced potassium current in rabbit cardiac Purkinje fibers show relaxation ? Arch. Int. Pharmac. Ther. 262, 322-323.

MULLINS, L.J. (1981).

The generation of electric currents in cardiac fibers by Na-Ca exchange. Am. J. Physiol. 236, C103-C110.



NARGEOT, J., GARNIER, D. and ROUGIER, O. (1981).

Analysis of the negative inotropic effect of acetylcholine on frog atrial fibers. *J. Physiol. Paris.* 77, 829-843.

NARGEOT, J., LESTER, H.A., NERBONNE, J.M. and ENGELS, J. (1983).

Time course of the increase in the myocardial slow inward current after a photochemically generated concentration jump of intracellular cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2395-2399.

NAWRATH, H. (1977).

Does cyclic GMP mediate the negative inotropic effect of acetylcholine in the heart. *Nature.* 267, 72-74.

NEW, W. and TRAUTWEIN, W. (1972).

The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. *Pflugers Arch.* 334, 24-38.

NEW, W. and TRAUTWEIN, W. (1972).

Inward currents in mammalian myocardium. *Pflugers Arch.* 334, 1-38.

NIEDERGERKE, R. (1963).

Movements of Ca in beating ventricles of the frog heart. *J. Physiol.* 167, 551-580.

NILIUS, B., HESS, P., LANSMAN, J.B. and TSIEN, R.W. (1985).

A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature*, 316, 443-446.

NOBLE, D. (1984).

The surprising heart : a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J. Physiol.* 353, 1-50.

NOMA, A., KOTAKE, H. and IRISAWA, H. (1980).

Slow inward current and its role mediating the chronotropic effect of epinephrine in the rabbit S.A node. *Pflugers Arch.* 388, 1-9.

NOWYCKY, M.C., FOX, A.P. and TSIEN, R.W. (1984).

Two components of calcium channel current in chick dorsal root ganglion cells. *Biophys. J.* 45, 36a.

OCHI, R. and TRAUTWEIN, W. (1971).

The dependance of cardiac contraction on depolarization and slow inward current. *Pflugers Archiv.* 323, 187-203.

OGAWA, Y. (1970).

Some properties of fragmented frog sarcoplasmic reticulum to its response to caffeine. *J. Biochem.* 67, 667-683.

OJEDA, C., ROUGIER, O. and TOURNEUR, Y. (1981).

Effects of Ca on acetylcholine induced current. Is IK<sub>1</sub> increased by acetylcholine in frog atrium ? Pflugers Archiv. 391, 57-59.

OPIE, L. (1982).

Role of cyclic nucleotides in heart metabolism. Cardiovasc. Res. 16, 483-507.

ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H. and BRANDT, P.W. (1974).

Calcium binding and tension developpement in detergent treated muscle fibers. J. Gen. Physiol. 63, 168-186.

PAGE, E. (1978).

Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane. Am. J. Physiol. 235. 5, C147-C158.

PAGE, E., Mc CALLISTER, L.P. and POWER, B.I. (1971).

Stereological measurements of cardiac ultrastructures implicated in excitation contraction coupling. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 68,1465-1466.

POTREAU, D. and RAYMOND, G. (1985).

Barium inhibition of the tonic component of frog atrial contraction. Pflugers Archiv. 404, 287-289.

POWELL, T. and TWIST, V.W. (1976).

A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and tolerance to calcium.

Biochem. Biophys. Res. Com. 72, 327-333.

PROKOPCZUK, A., LEWARTOWSKI, B. and CZARNECKA, M. (1973).

On the cellular mechanism of inotropic action of acetylcholine in isolated rabbit and dog atria. Pflugers Archiv. 339, 305-316.

RENAUD, J.F., MEAUX, J.P., ROMÉY, G., SCHMID, A. and LADZUNSKI, M. (1984).

Activation of the voltage dependent Ca channel in rat heart cells by dihydropyridines derivatives. Biochem. Biophys. Res. Com. 125, 405-412.

REUTER, H. (1967).

The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium concentrations. J. Physiol. 192, 479-492.

REUTER, H. (1974).

Localization of beta adrenergic receptors and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle. J. Physiol. 242, 429-451.

REUTER, H. (1983).

Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. Nature, 301, 569-574.

REUTER, H. and SEITZ, N. (1968).

The dependance of calcium efflux from cardiac muscle and external ion composition. *J. Physiol.* 195, 451-470.

REUTER, H. and SCHOLZ, H.S. (1977).

A study on the ion selectivity and the kinetic properties of the calcium dependant slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.* 264, 17-47.

REUTER, H., STEVENS, C.F., TSIEN, R.W. and YELLEN, C. (1982).

Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature*, 297, 504-505.

RICH, T.L. and LANGER, G.A. (1975).

A comparison of excitation contraction coupling in heart and skeletal muscle : an examination of "Ca-induced Calcium release". *J. Moll. Cell. Cardiol.* 7, 747-765.

RINGER, S. (1883).

A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4, 29-42.

ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUIL, Y.M. and CORABOEUF, E. (1969).

Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflugers Archiv.* 308, 91-110.

SANGUINETTI, M.C. and KASS, R.S. (1984).

Regulation of cardiac calcium channel current and contractile activity by the dihydropyridine calcium channel BAY K 8644 is voltage dependant. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 16, 667-670.

SCHRAMM, M., THOMAS, G., TOWART, R. and FRANCKOWIAK G. (1983).

Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca channels. *Nature*, 303, 535-537.

SEIBEL, K., KAREMA, K., TAKEYA, K. and REITER, M. (1978).

Effect of noradrenaline on an early and late component of the myocardial contraction. *Naunyn Schmiedbergs' Arch. Pharmacol.* 305, 65-74.

SIEGELBAUM, S.A. and TSIEN, R.W. (1980).

Calcium activated transient outward current in calf cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.* 299, 485-506.

SOLARO, R.J., WISE, R.M., SHINER, J.S. and BRIGGS, F.N. (1974).

Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation. *Circ. Res.* 34, 525-530.

STANDEN, B.B. and STANDFIELD, P.R. (1982).

A binding site model for calcium channel inactivation that depends on calcium entry. *Proc. Res. Soc. Cond. B* 217, 101-110.

SUAREZ-KURTZ, G. and SORENSON, A.L. (1979).

Dissociation of action potentials from contraction in single crab muscle fibers. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 3029-3030.

SUAREZ-KURTZ, G. (1982).

The role of Ca in excitation contraction coupling in crustacean muscle fibers. Can. J. Physiol. Pharmacol. 60, 446-458.

SUTHERLAND, E.W. and RALL, T.W. (1958).

fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J. Biol. Chem. 232, 1077-1091.

TADA, M., KIRCHBERGER, M.A. and KATZ, A.M. (1975).

Phosphorylation of a 22000 dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3-5 monophosphate dependant protein kinase. J. Biol. Chem. 250, 2640-2647.

TEN EICK, R.T., NAWRATH, H., Mc DONALD, T.F. and TRAUTWEIN, W. (1976).

On the mechanism of the negative inotropic effect of acetylcholine. Pflugers Archiv. 361, 207-213.

THOMAS, G., CHUNG, M., and COHEN, C.J. (1985).

Dihydropyridine (BAY K 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. Circ. Res. 56, 87-96.

TILLOTSON, D. (1979).

Inactivation of Ca conductance dependant on entry of Ca ions in molluscan neurons. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77, 1497-1500.

TILLOTSON, D. and HORN, R. (1978).

Inactivation without facilitation of calcium conductance in Cs loaded neurones of Aplysia. Nature. 273, 312-314.

TRAUTWEIN, W., Mc DONALD, T.F. and TRIPATHI, O. (1975).

Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. Pflugers Archiv. 354, 55-74.

TRAUTWEIN, W., TANIGUCHI, J. and NOMA, A. (1982).

The effects of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. Pflugers Archiv. 392, 307-314.

TSANOO, A., YOSHII, M. and NARAHASHI, T. (1984).

Two types of calcium channels in neuroblastoma cells and their sensitivities to cAMP. Soc. Neurosci. 10, 527(a).

TSANOO, A., YOSHII, M. and NARAHASHI, T. (1985).

Differential Block of two types of calcium channels in neuroblastoma cells. Biophys. J. 47, 433(a).



TSIEN, R.W. (1973).

Adrenaline like effects of intracellular iontophoresis of cAMP in cardiac Purkinje fibers. *Nature Neuro. Biol.* 245, 120-122.

TSIEN, R.W. (1985).

Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 45, 341-358.

VAN KERKHOVE, E and CARMELIET, E. (1971).

Sr movements in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol. Paris*, 63, 147A.

VASSORT, G. (1973).

Existence of two components in frog cardiac mechanical activity : influence of Na ions. *Eur. J. Cardiol.* 1, 163-168.

VASSORT, G., ROUGIER, O. and FAVELIER, J. (1971).

Influence du potentiel de membrane et des courants transmembranaires sur l'activité contractile des faisceaux sino auriculaires de la grenouille. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 79, 401-406.

VASSORT, G. and ROUGIER, O. (1972).

Membrane potential and slow inward current dependance of frog cardiac mechanical activity. *Pflugers. Archiv.* 331, 191-203.

WENDT, I.R. and STEPHENSON, D.G. (1983).

Effects of caffeine on Ca activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibers of rat. *Pflugers. Archiv.* 398, 210-216.

WINEGRAND, S. (1973).

Intracellular calcium binding and release in frog heart. *J. Gen. Physiol.* 62, 693-706.

WOHLFART, B and NOBLE, M.J. (1982).

The cardiac excitation contraction cycle. *Pharmac. Ther.* 16, 1043.

WOOD, E.H., HEPPNER, R.L. and WEIDMANN, S. (1969).

Inotropic effects of electric currents. *Circ. Res.* 24, 409-445.

YAMAMOTO, N. and KASAI, H. (1982).

Kinetics of the actions of caffeine and procaine on the Ca gated cation channel in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Biochem.* 92, 477-484.

YATANI, A., IMOTO, Y. and GOTO, M. (1984).

The effects of caffeine on the electrical properties of isolated single rat ventricular cells. *Jap. J. Physiol.* 34, 337-349.

YOSHII, M., TSUNNOO, A. and NARAHASHI, T. (1985).

Different properties in two types of calcium channels in Neuroblastoma cells. *Biophys. J.* 47, 433a.



HONORE Eric

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE  
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES  
UNIVERSITE DE LILLE I

**MISE EN EVIDENCE ET ORIGINE DE DEUX COMPOSANTES DE LA  
CONTRACTION DU MUSCLE PAPILLAIRE DE COBAYE**

Mots-clefs : Couplage Excitation-Contraction  
Canaux Calciques - Contraction Biphasique  
Potentiel d'Action - Neurotransmetteurs  
Strontium - Dihydropyridines  
Inhibiteurs Inorganiques du Ca

**RESUME DE LA THESE**

En l'absence du mécanisme d'échange Na-Ca, il peut être enregistré au niveau de certaines préparations cardiaques une contraction biphasique.

La première composante de contraction est liée à la libération de Ca par le réticulum sarcoplasmique déclenchée par le courant entrant calcique rapide.

La seconde composante de contraction est liée à l'activation directe des protéines contractiles par le calcium transporté par le courant entrant lent.

Seuls les canaux calciques lents sont sensibles aux diverses substances telles que l'isoprotérénol, l'acétylcholine et les dihydropyridines.

Les effets particuliers des ions Sr lorsqu'ils substituent les ions Ca en totalité tendent bien à montrer que le canal calcique rapide est plus spécifique aux ions Ca que ne l'est le canal calcique lent.

La contraction des cellules cardiaques pourrait de ce fait correspondre à trois composantes :

- deux composantes phasiques liées aux deux courants entrants de Ca
- une composante tonique liée à l'influx de Ca produit par l'activation du mécanisme d'échange Na-Ca.

**JURY**

Président : Monsieur le Professeur A. ROBELET  
Rapporteurs: Monsieur le Professeur P. GUILBAULT  
Monsieur le Professeur J. NARGEOT  
Examineurs : Monsieur le Professeur C.E. CHALLICE  
Monsieur le Professeur B. DUPUIS ..  
Monsieur le Professeur Y.M. GARGOUIL