

50376
1987
87

50376
1987
87

N° d'ordre : 1384

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

(3ème cycle)

par

Fatim-Zohra LAMGHARI MOUBARRAD

MISE EN EVIDENCE ET ANALYSE D'UNE CONDUCTANCE AUX IONS H^+
DEPENDANT DU POTENTIEL DANS L'OVOCYTE FOLLICULAIRE IMMATURE

DE RANA ESCULENTA.



Soutenue le 9 juin 1987 devant la Commission d'Examen

| | |
|---------------------|---|
| M. Jean-Marc DUBOIS | Directeur de recherche au CNRS - ORSAY |
| M. Pierre GUILBAULT | Professeur à l'Université de Lille I |
| M. Raymond KADO | Directeur de recherche au CNRS - GIF SUR YVETTE |
| M. Maurice PORCHET | Professeur à l'Université de Lille I |

Travail réalisé au laboratoire de Physiologie Cellulaire-de
l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois
et Laboratoire Associé au CNRS n° 308.

Avant-propos

Je tiens à remercier vivement M^r GUILBAULT de m' avoir acceptée dans son laboratoire et de me m' avoir jamais épargné ses aides et ses conseils.

Je remercie M^r DUBOIS, M^r KADO et M^r PORCHET d' avoir accepté de consacrer leur temps pour l'examen de mon travail.

Je remercie tous les gens qui m' ont aidé à réaliser ce travail en particulier M^{me} PLANCO, M^{me} ANSCUTTER et M^{me} BERNARD.

Je remercie également tous les membres du laboratoire pour leur soutien et leur sympathie.

Lan

INTRODUCTION p. 1

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES DIFFERENTS
COURANTS SPECIFIQUES MIS EN EVIDENCE DANS LA
MEMBRANE DE L'OVOCYTE ET DE L'OEUF p. 4

1/ COURANT SODIQUE (I_{Na}) p. 4

2/ COURANT D'IONS CHLORURE : I_{Cl} p. 6

3/ COURANT CALCIQUE : I_{Ca} p. 7

4/ COURANT DE PROTONS : I_H p. 9

5/ COURANT POTASSIQUE : I_K p. 11

MATERIEL ET METHODES p. 13

1/ PREPARATION p. 13

2/ MESURES ELECTRIQUES p. 13

3/ SOLUTIONS p. 16

RESULTATS ET DISCUSSION p. 18

I - POTENTIEL DE MEMBRANE - RESISTANCE ET CAPACITE MEMBRANAIRES p. 18

1/ Potentiel de membrane p. 18

2/ Résistance membranaire p. 23

3/ Capacité membranaire p. 24

II - COURANTS ET CONDUCTANCES MEMBRANAIRES p. 25

A/ Courant entrant activé lors des hyperpolarisations p. 25

B/ Courants sortants activés lors de dépolarisations et conductances correspondantes p. 27

| | |
|---|-------|
| 1/ Etude du courant sortant global | p. 27 |
| 2/ Analyse de g_K | p. 33 |
| a - Détermination du nombre de particules impliquées dans l'ouverture des canaux aux ions K^+ | p. 33 |
| b - Calcul de la conductance maximale aux ions K^+ | p. 36 |
| 3/ Mise en évidence de la deuxième composante de courant et de la conductance correspondante après dissection du courant sortant global | p. 39 |
| 4/ Analyse de g_H | p. 40 |
| a - Sélectivité des canaux ioniques par où passe le courant dynamique sortant I_H | p. 43 |
| b - Analyse quantitative de g_H | p. 49 |
| <i>Détermination du nombre de particules impliquées lors de l'ouverture du canal I_H</i> | p. 49 |
| <i>Déactivation de I_H</i> | p. 50 |
| <i>Détermination de la relation liant la variable d'activation n_∞ au potentiel.</i> | p. 54 |
| <i>Constantes de vitesse α et β dépendant du potentiel</i> | p. 57 |
| C/ Effet du changement du pH externe sur le courant I_H , sa cinétique et la conductance aux ions H^+ | p. 58 |
| 1/ Effet sur le courant I_H | p. 58 |
| 2/ Effet du pH sur les constantes de temps d'activation et de déactivation | p. 63 |
| D/ Effet du Cd sur le courant I_H | p. 65 |
| RESUME ET CONCLUSION | p. 69 |
| BIBLIOGRAPHIE | p. 72 |

INTRODUCTION

La maturation ovocytaire et l'ovulation concernent les processus qui traduisent notamment les changements de perméabilité ionique membranaire de l'ovocyte et de l'oeuf. Les recherches relatives à leurs propriétés électriques ont pour but l'analyse des mécanismes de l'ovogénèse et des premiers stades embryonnaires (pour de plus amples détails, voir la revue de HAGIWARA et JAFFE, 1979). En effet, il est connu qu'une augmentation de la perméabilité sodique de l'ovocyte d'amphibien apparaît lors de la maturation ; cette perméabilité jouant un rôle dans l'augmentation de l'activité du sodium intracellulaire, $a_{\text{Na}i}$, (SCHLICHTER, 1983 a-b). Cette élévation de $a_{\text{Na}i}$ durant le développement, pourrait rendre compte de la disparition de la perméabilité sélective aux ions K^+ observée dans l'ovocyte d'amphibien (Maeno, 1959 ; Morill et al., 1966) et dans l'oeuf d'étoile de mer (MIYAZAKI et al. 1975).

Très récemment, il est proposé que chez les amphibiens, les ions H^+ seraient impliqués lors de la stimulation métabolique de l'ovocyte et de l'oeuf correspondant aux mécanismes de maturation et d'activation ovocytaires (BARISH et BAUD, 1984). Cette stimulation métabolique se traduit par une augmentation de la synthèse protéique (SHIH et al. 1978) associée à une alcalinisation intracellulaire (LEE et STEINHARDT, 1981 ; HOULE et WASSERMAN, 1983). Selon certains auteurs, cette synthèse protéique serait en effet contrôlée par le pH intracellulaire dans l'ovocyte d'amphibien (GRAINGER et al. 1979 ; WINKLER et al., 1980).

A l'heure actuelle, deux mécanismes bien connus peuvent rendre compte de la régulation du pH intracellulaire, l'un concerne le mécanisme d'échange Na-H, l'autre concerne l'activation membranaire d'une conductance aux ions H^+ . En ce qui concerne l'ovocyte d'oursin, WHITAKER et STEINHARDT (1982) proposent que l'alcalinisation intracellulaire est produite lors de la stimulation métabolique par l'activation du mécanisme d'échange Na-H. Par contre, pour BARISH et BAUD (1984), la mise en évidence d'une activation d'une conductance très spécifique aux protons rendrait compte par l'apparition d'un courant sortant de protons, de la diminution de a_{H_i} et donc de l'augmentation du pH intracellulaire.

En accord avec les travaux de BARISH et BAUD (1984), il est montré dans ce travail qu'il existe aussi chez l'ovocyte de *Rana esculenta* un courant sortant de protons, I_H , activé lors de dépolarisations membranaires. La mise en évidence de cette conductance très spécifique aux protons, est proposée aussi en 1985 par LAMGHARI MOUBARRAD. L'analyse de cette conductance dépendant du potentiel et du temps fait l'objet de ce mémoire. En effet, ce courant I_H observé sur l'ovocyte de Rana constitue une très large part du courant dynamique sortant global activé lors de dépolarisations membranaires à partir d'un potentiel de membrane de l'ordre de - 50 mV. La sensibilité du potentiel d'inversion de I_H à la concentration extracellulaire en ions H^+ suggère que la conductance correspondante est très fortement sélective aux protons. Il est montré également, en accord avec les observations de BARISH et BAUD (1984) sur l'ovocyte d'*Ambystoma*, qu'associée à l'activation de la conductance aux protons, une activation également spécifique aux ions K^+ apparaît. Enfin dans l'ovocyte de *Rana esculenta*,

tout comme dans de nombreux ovocytes de différentes espèces et en particulier dans l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al., 1976 ; HAGIWARA et YOSHII, 1979), il existe une conductance activée lors d'hyperpolarisations membranaires ; par les canaux ioniques correspondants passe un courant entrant porté par les ions K^+ .

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LES DIFFERENTS
COURANTS SPECIFIQUES MIS EN EVIDENCE DANS LA
MEMBRANE DE L'OVOCYTE ET DE L'OEUF.

Les ovocytes et les oeufs possèdent des canaux ioniques sélectifs dont l'activation dépend du potentiel de membrane (voir les revues de HAGIWARA et JAFFE, 1979 et de HAGIWARA, 1983). Ces canaux présentent beaucoup de similitudes de fonctionnement avec ceux présents dans les membranes excitables. Parmi les courants les plus communément mis en évidence et analysés, citons les courants de Na, K, Ca, Cl et plus récemment de protons. Les canaux membranaires par où passent ces courants présentent une sélectivité plus ou moins stricte vis à vis d'une espèce ionique.

1/ COURANT SODIQUE (I_{Na})

Chez les anoures (*Rana*, *Xenopus*) et chez les pleurodèles (*Ambystoma*), une conductance sodique dépendant du potentiel, sans inactivation, est observée à différents stades du développement de l'ovocyte (BAUD et al., 1982 ; SCHLICHTER, 1983 a).

L'excitabilité de la membrane de l'oeuf est mise en évidence pour la première fois en 1972 chez les tuniciers par MIYAZAKI et al. Cette excitabilité, bien que dévolue à l'activation d'une conductance aux ions Na^+ , correspond généralement pour les ovocytes et les oeufs des diverses espèces animales étudiées, à l'activation de canaux sélectifs aux ions Ca^{++} (pour plus de détails, voir la revue de HAGIWARA et JAFFE, 1979). Récemment, l'activation de canaux sodiques permettant la genèse d'une activité électrique, de même nature que celle des membranes excitables, est retrouvée dans l'ovocyte d'amphibien : chez *Rana* par SCHLICHTER (1983 a) et chez

Xenopus par KADO et al. (1979) ; BAUD et al. (1982) ; BAUD (1983) et BAUD et KADO (1984). Le canal sodique de *Xenopus* diffère des autres mis en évidence dans la membrane de l'oeuf de tunicier et de grenouille, dans la mesure où il doit être rendu disponible pour pouvoir lors de la dépolarisation, être activé ; cette disponibilité apparaissant suite à une très ample et durable dépolarisation. Ces canaux sodiques dans les ovocytes, activés par le potentiel ne présentent pas, comme dans le cas d'une fibre excitable nerveuse ou musculaire, de processus d'inactivation.

Quant à la signification biologique de ce courant I_{Na} dans les processus de maturation ovocytaire, aucun argument expérimental décisif n'a encore été apporté. Cependant, l'interprétation que donne SCLICHTER (1983 b) est la suivante : l'accroissement de l'activité du Na intracellulaire (a_{Na_i}) produite par le "potentiel d'action" (activation de g_{Na}) peut être à l'origine de la maturation ovocytaire. Cette interprétation est en accord avec les résultats obtenus sur l'ovocyte de *Xenopus* où il est montré que l'activation de l'ATPase dépendant du Na intracellulaire et du K extracellulaire (pompe Na/K) inhibe la maturation ovocytaire (WALLACE et STEINHARDT, 1977), alors qu'à l'inverse l'inhibition de cette enzyme la facilite (VITTO et WALACE, 1976). En 1985, une autre interprétation est donnée par PERES et MANCINELLI. Décrivant également un courant sodique dans l'oeuf de *Xenopus*, ils proposent que ce courant intervient lors de la fécondation en empêchant une dépolarisation par trop ample de la membrane cellulaire, dépolarisation survenant lors du potentiel d'activation qui est l'équivalent du potentiel d'action. Ce potentiel d'action est dû à un courant entrant porté par les ions Cl^- , ce qui, compte-tenu de la charge de ces anions, conduit à un efflux de ces ions chlorure à travers la membrane.

2/ COURANT D'IONS CHLORURE : I_{Cl}

Un courant d'ions Cl^- s'écoulant à travers la membrane d'ovocyte de *Xenopus* et de *Rana*, activé par des dépolarisations membranaires est observé par différents auteurs. C'est ainsi qu'en 1979, ROBINSON décrit le premier, dans l'ovocyte immature de *Xenopus*, un canal spécifique aux ions Cl^- dont l'activation requiert certes une dépolarisation membranaire, mais également un accroissement de l'activité du Ca intracellulaire. Sur la même préparation, MILEDI (1982), BARISH (1983), PERES et BERNARDINI (1983) décrivent ce même canal Cl dépendant du voltage et de l'entrée de Ca. Ce courant de Cl est mis aussi en évidence par SCHLICHTER (1983) sur l'ovocyte mature de *Rana pipiens*. De même PERES et MANCINELLI (1985) signalent également sa présence dans l'ovocyte mature de *Xenopus*, à la condition que l'activation ovocytaire soit induite, ce qui amène à penser selon ces derniers auteurs que les canaux par où s'écoule I_{Cl} seraient fonctionnellement différents de ceux décrits dans l'ovocyte immature. En effet, pour PERES et MANCINELLI, il existerait soit deux types de canaux Cl présentant des caractéristiques d'activation différentes, soit un seul type de canaux possédant une structure de base mais dont le mécanisme de fonctionnement changerait au cours de la maturation.

Quant à la signification biologique de ce courant Cl , comme dans le cas de I_{Na} , on n'est confronté qu'à des hypothèses. Pour certains auteurs, les variations de perméabilité aux ions chlorure, en bref l'activation de canaux Cl dans la membrane ovocytaire, pourrait être impliquées dans des processus en relation avec des changements de potentiel de membrane, telles

que la réponse à l'acétylcholine (KUSANO, MILEDI et STINNAKRE, 1977, 1982) et à l'adénosine (LOTAN, COHEN, DASCAL et LASS, 1982). Le courant de Cl observé lors de l'activation ovocytaire associée au processus de maturation, serait responsable de la dépolarisation membranaire des ovocytes d'amphibiens au moment de la fécondation. Ce potentiel d'activation, correspondant à une forte dépolarisation membranaire, assurerait un blocage rapide de la polyspermie selon PERES et MANCINELLI (1985).

3/ COURANT CALCIQUE : I_{Ca}

Le courant entrant calcique s'écoulant à travers la membrane de l'oeuf paraît présenter des caractéristiques très voisines de celles décrites pour le courant I_{Ca} qui s'écoule à travers les membranes excitables (pour plus de détails voir la revue de HAGIWARA et BYERLY, 1981 et celle de ECKERT et CHAD, 1984).

En fait, ce sont deux courants entrants de Ca qui passent à travers la membrane de l'oeuf de tunicier, ainsi qu'à travers celle de l'oeuf d'étoile de mer (OKAMOTO et al. 1976 ; HAGIWARA et al. 1975). Plus récemment, FOX et KRASNE (1984) décrivent également deux composantes de courant calcique dans l'oeuf d'un polychète marin, *Neanthes arenacodentatus*. Les deux types de canaux à travers lesquels passent ces composantes calciques sont appelées par HAGIWARA et al. (1975) canal I pour I_{Ca_I} et canal II pour $I_{Ca_{II}}$. Si le fonctionnement du canal II apparaît le même dans les trois structures (oeuf de tunicier, oeuf d'étoile de mer et oeuf du

polychète marin), il n'en est pas de même en ce qui concerne le canal I. En effet, des différences apparaissent d'un oeuf à l'autre ; en particulier si dans l'oeuf de *Necanthes* le Ca s'écoule à travers le canal I, c'est par contre le Na qui passe à travers ce canal dans l'oeuf de tunicier alors que dans l'oeuf d'étoile de mer le Ca ne peut l'emprunter qu'en présence de Na extracellulaire. Ainsi, ces différences peuvent n'être que fortuites dans la mesure où les oeufs sont interrogés à des stades différents de développement. Cependant, le possible fonctionnement différent du canal I pourrait également traduire de vraies différences évolutives. De même, l'absence d'une composante sodique de courant entrant à un stade de développement de l'ovocyte peut se concevoir dans la mesure où en 1985 O'DONNEL décrit au niveau de l'ovocyte d'insecte non une composante sodique, mais une composante calcique responsable dans les conditions de courant imposé, du potentiel d'action ; de l'analyse de ses travaux et de ceux de différents auteurs, ce dernier auteur est amené à proposer que la réponse calcique apparaît au cours de l'embryogénèse avant la réponse sodique.

Enfin, comme il est connu que l'influx de Ca au niveau des terminaisons synaptiques induit la libération de transmetteurs (KATZ et MILEDI, 1967, 1969, 1971) et qu'il est à l'origine de la contraction des fibres musculaires, il est possible de supposer avec de nombreux auteurs, que le courant de Ca à travers les canaux calciques de l'oeuf puisse jouer un rôle important dans les processus cellulaires tels que l'activation de l'oeuf et le clivage. En effet, plusieurs travaux suggèrent que la libération du Ca intracellulaire contrôle l'activation de l'oeuf (STEINHARDT et EPEL, 1974 ;

STEINHARDT et al., 1974). En accord avec ces interprétations, il est proposé que les changements d'activité du Ca intracellulaire, suite à un courant entrant de Ca, pourrait servir de signal pour induire le développement de l'oeuf (voir revue de WHITAKER et STEINHARDT, 1982). Cependant, en 1985, O'DONNELL suggère que ces canaux pourraient ne pas être impliqués dans les processus associés à la fécondation mais qu'ils devraient être présents à l'état latent en prévision de leur développement ultérieur en particulier dans les cellules excitables. De même, BARISH (1984) suggère que les divers types de canaux ioniques peuvent se répartir dans des proportions liées aux différents types cellulaires apparaissant au cours du développement. La même répartition de ces canaux serait la cause de l'existence d'une excitabilité cellulaire chez le jeune embryon comme cela est montré par JAFFE et GUERRIER (1981) chez le mollusque *Dentalium*.

4/ COURANT DE PROTONS : I_H

Dans les neurones de mollusques, BYERLY et al., (1984) décrivent un courant sortant porté par les protons, courant correspondant à celui décrit comme "non spécifique" par THOMAS et MEECH (1982) dans les neurones d'*Hélix*, par BYERLY et HAGIWARA (1982) dans les neurones perfusés de *Lymnae* et par KOSTYUK et al. (1977) dans ceux d'*Hélix*. Ce courant correspond aussi au courant résiduel observé dans la fibre musculaire de balane (KEYNES et al., 1973). Le courant I_H trouvé dans l'ovocyte d'amphibien *Ambystoma* (BARISH et BAUD, 1984) et de *Rana* (LAMGHARI MOUBARRAD, 1985) a beaucoup de caractéristiques en commun avec ces divers courants non spécifiques et le courant I_H décrit par BYERLY et al., (1984). Ces divers

courants ont en commun le fait qu'ils résistent aux ions TEA, qu'ils présentent des cinétiques d'activation en fonction du temps et du potentiel équivalentes, que leur potentiel d'inversion se déplace dans la direction dépolarisante avec l'augmentation de concentration extracellulaire de protons et qu'enfin leur amplitude est très fortement réduite en présence de faibles concentrations de Cd.

Comme ce courant I_H est très similaire chez les vertébrés et les invertébrés, il apparaît donc actuellement jouer un rôle majeur dans la régulation du pH intracellulaire. En effet, cette interprétation est maintenant avancée suite aux travaux concernant le maintien du pH intracellulaire dans de nombreux types cellulaires (pour plus de détails voir la revue de ROOS et BORON (1981) et les travaux de BYERLY et al. (1984), de BYERLY et MOODY (1985)). Cette régulation du pH interne par l'activation d'une conductance aux protons dépendant du potentiel est avancée pour la première fois en 1982 par THOMAS et MEECH. De même, lors de la maturation et de l'activation ovocytaires, l'alcalinisation intracellulaire suite à une sortie d'ions H^+ conduit à attribuer aux ions H^+ un rôle régulateur dans la stimulation métabolique de l'ovocyte et de l'oeuf (SMITH, 1981 ; WHITAKER et STEINHARDT, 1982). Ainsi, il apparaît possible d'envisager que le flux d'ions H^+ s'écoulant à travers les canaux correspondants puissent contribuer aux variations physiologiques du pH intracellulaire des ovocytes comme cela est particulièrement bien décrit dans les photorécepteurs et le muscle squelettique (BROWN et al., 1976 ; BROWN et MEECH, 1979 ; Mac DONALD et JOBSIS, 1976). La conductance aux protons activée lors de la dépolarisation contribuerait à la régulation du pH intracellulaire dans les cellules qui présentent un ample potentiel d'action ; cette interprétation

est proposée par différents auteurs et en particulier par BYERLY et al. (1984). Ces auteurs suggèrent que le rôle des canaux aux ions H^+ dans les neurones de mollusques est de permettre de compenser l'acidification du milieu intracellulaire par le biais du courant sortant I_H activé par la dépolarisation. Ainsi, la rapide acidification intracellulaire qui survient après une suite de potentiels d'action pourrait de ce fait être compensée (AHMED et CONNOR, 1980).

5/ COURANT POTASSIQUE : I_K

KATZ en 1949 étudiant les propriétés de la membrane de la fibre musculaire squelettique de grenouille en milieu isotonique de sulfate de potassium, montre que la résistance membranaire est faible lors de l'augmentation d'amplitude du potentiel de membrane (hyperpolarisation membranaire), mais élevée pour de faibles dépolarisations. Il s'agit de la mise en évidence de deux propriétés de rectification de la membrane : 1) la rectification de sens entrant ou rectification anormale qui apparaît lors des hyperpolarisations ; 2) la rectification de sens sortant ou rectification normale apparaissant lors des dépolarisations. Ces deux rectifications correspondent à l'activation de deux types de canaux ioniques par où s'écoulent les ions K^+ produisant soit un courant entrant de K quand il est associé à la rectification anormale, soit un courant sortant de K quand il est associé à la rectification normale.

Pour la première fois, la rectification anormale est décrite dans l'oeuf de tunicier par TAKAHASHI et al. (1971) puis confirmée sur cette même préparation par MIYAZAKI et al. en 1974. De même, HAGIWARA et al. (1976, 1977 et 1979) décrivent cette rectification dans l'oeuf d'étoile de mer. Dans ces deux préparations, l'activation de la conductance de membrane conduit à l'apparition d'un courant entrant de K. De plus, ce courant de rectification de sens entrant chez l'oeuf d'étoile de mer est fortement réduit voire supprimé quand les ions K^+ extracellulaires sont remplacés par des ions Rb^+ ou Cs^+ (HAGIWARA et al., 1976). Cette abolition du courant entrant de rectification est conforme aux résultats acquis antérieurement dans les mêmes conditions ioniques sur la fibre musculaire de grenouille par ADRIAN (1964), BENZANILLA et AMSTRONG (1972), GAY et STANFIELD (1977) et ISENBERG (1976). Par contre, si le TEA, présent à faible concentration dans le milieu extracellulaire, inhibe le courant de rectification I_K de la fibre musculaire de grenouille (STANFIELD, 1970) il n'a, par contre, aucun effet sur celui de l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al. 1976).

En ce qui concerne le courant sortant de rectification, porté par les ions K^+ , si sa présence lors du potentiel d'action des cellules nerveuses et musculaires contribue à la repolarisation de la membrane, sa signification biologique dans l'oeuf n'est pas encore déterminée. De toute façon, comme cela est montré en particulier par BARISH et BAUD (1984) sur l'ovocyte d'*Ambystoma*, la participation de ce courant potassique au courant sortant global est faible, puisque ces derniers auteurs montrent que la composante majoritaire est celle qui correspond au courant sortant de protons.

MATERIEL ET METHODES

1/ PREPARATION

Les grenouilles femelles (*Rana esculenta*), en provenance du Centre d'Elevage d'Ardenay, sont maintenues dans des bacs contenant de l'eau régulièrement renouvelée à une température de 10°C.

Les ovaires sont dégagés et extirpés après une petite incision effectuée au niveau de la paroi abdominale des animaux préalablement "démédullés" et "décérébrés". Les ovocytes sont ensuite dégagés de leur gangue et placés dans le liquide physiologique de référence (liquide de Ringer) en vue de leur séparation. Une fois les ovocytes séparés, le mieux possible des uns des autres, par une dilacération mécanique à l'aide de pinces fines, ils sont ensuite incubés dans le milieu de Ringer dépourvus de Ca et additionné de collagénase (Type IA) à raison de 2 mg/ml pendant 2 à 3 h à température ambiante. Après ce temps, les ovocytes ainsi "défolliculés" sont rincés dans le Ringer et chaque ovocyte à tester est placé dans la cuve d'expérimentation dont le schéma synoptique est donné à la figure 1.

2/ MESURES ELECTRIQUES

Le schéma électrique du montage utilisé est présenté à la figure 2. Le potentiel de membrane est mesuré par l'intermédiaire de 2 microélectrodes, l'une de référence (microélectrode 1) au contact du milieu extracellulaire, l'autre (microélectrode 2) implantée dans l'ovocyte. Chaque

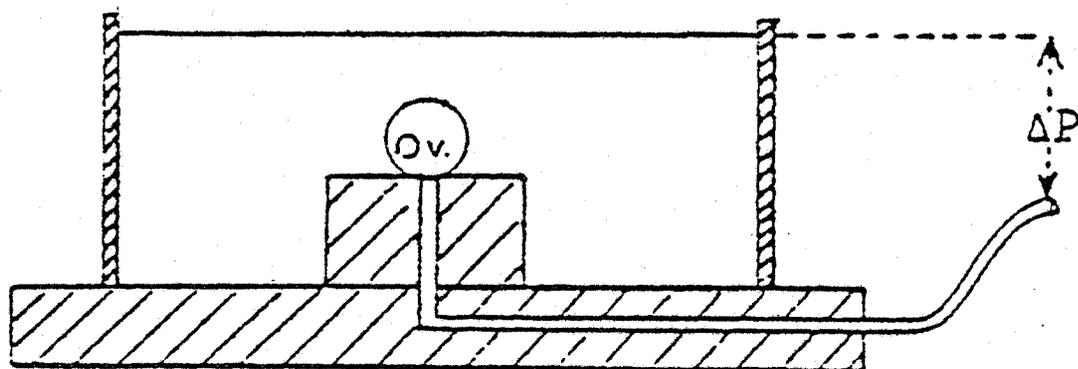


Figure 1

Schéma synoptique de la cuve d'expérimentation et en particulier du maintien de l'ovocyte (Ov) au centre de la cuve par une dépression ΔP .



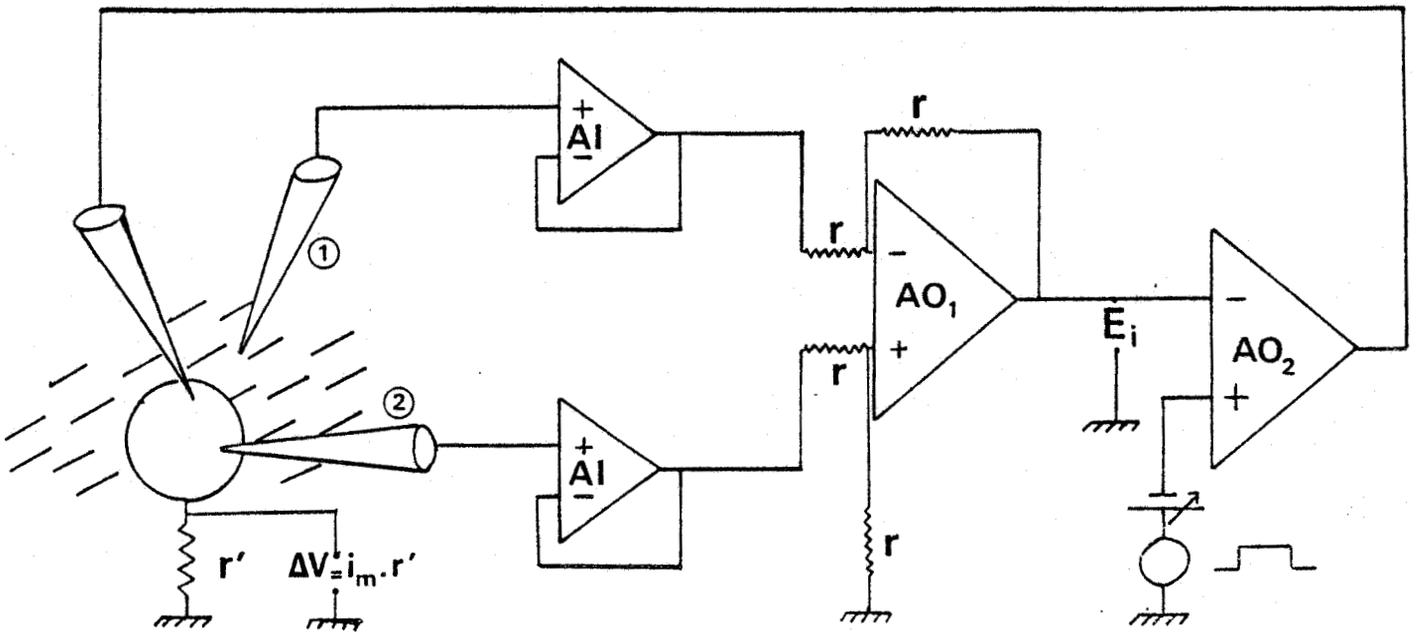


Figure 2

Schéma synoptique du montage électrique utilisé pour l'enregistrement du courant de membrane dans les conditions de potentiel imposé.

A.I. Adaptateur d'impédance ; A.O. Amplificateur opérationnel.

électrode par l'intermédiaire d'un adaptateur d'impédance mesure un potentiel par rapport au potentiel de terre. La différence de ces deux potentiels correspondant au potentiel transmembranaire, est mesurée par l'intermédiaire de l'amplificateur opérationnel AO_1 monté de telle façon que le gain en tension soit de 1. Dans les conditions de potentiel imposé, ce potentiel de membrane est à chaque instant comparé au potentiel que l'on désire imposer, ceci par l'intermédiaire de l'amplificateur AO_2 monté en contre réaction totale. Le courant débité par AO_2 , correspondant au courant membranaire, est mesuré par l'intermédiaire de la chute de tension qu'il provoque aux bornes de la résistance r' placée entre le milieu extracellulaire et le potentiel de terre.

3/ SOLUTIONS

Le milieu physiologique de référence utilisé est le liquide de Ringer dont la composition ionique en mM est la suivante :

NaCl = 96 ; KCl = 2 ; $CaCl_2$ = 1,8 ; $MgCl_2$ = 1 ; HEPES = 5
ajusté au pH 7,4 par addition convenable de NaOH. La composition des différents milieux utilisés est donnée dans le tableau 1.

| Milieux | NaCl mM | KCl mM | CaCl ₂ mM | MgCl ₂ mM | HEPES mM | Autres substances mM |
|-----------------------------|------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------|--|
| Ringer normal | 96 | 2 | 1,8 | 1 | 5 | |
| Ringer hyper- potassique | 50 | 48 | 1,8 | 1 | 5 | |
| Ringer Cs | 78 | 0 | 1,8 | 1 | 5 | Cs Cl 20 |
| Ringer TEA | 0 | 2 | 1,8 | 1 | 10 | TEA Cl 120 |
| Ringer Cd | 78 | 0 | 1,8 | 1 | 5 | Cs Cl = 20 Cd Cl ₂ = 0,3 |
| Ringer pour collagénase | 82,5 | 2 | 0 | 1 | 5 | Collagénase type IA 2 mg/l |



Tableau n° 1

RESULTATS ET DISCUSSION

I - POTENTIEL DE MEMBRANE - RESISTANCE ET CAPACITE MEMBRANAIRES

Ces caractéristiques électriques membranaires sont effectuées sur des ovocytes immatures de *Rana esculenta* dont le diamètre est d'environ 1 mm, ceci dans le but d'obtenir des résultats homogènes puisqu'il est bien connu que les perméabilités ioniques varient au cours de la maturation.

1/ Potentiel de membrane (E_m)

La valeur moyenne du potentiel de membrane dans les conditions de référence c'est-à-dire pour les ovocytes placés dans le milieu de Ringer à un pH de 7,4 est de $- 50 \pm 5,3$ mV. Cette valeur moyenne de E_m diffère notablement de celle donnée par ZIEGLER et MORRILL (1977) en ce qui concerne les ovocytes "défolliculés" de *Rana* ($- 77 \pm 2$ mV) alors qu'en absence de "défolliculation", la valeur qu'ils donnent n'est que de $- 36 \pm 2$ mV. Cette différence peut s'expliquer si l'on tient compte du stade de développement des ovocytes et/ou de la composition ionique du milieu extracellulaire utilisé. Il est en effet connu que le potentiel de membrane dépend largement de la composition ionique du milieu extracellulaire. WALLACE et STEINHARDT (1977) donnent une valeur moyenne de $- 65 \pm 2$ mV pour les ovocytes "défolliculés" de *Xenopus* alors que ces mêmes ovocytes avec leurs follicules, présentent un potentiel membranaire de l'ordre de $- 27 \pm 2$ mV. L'accroissement de la valeur du potentiel de membrane qui fait suite à la "défolliculation" serait, pour ces derniers auteurs, la conséquence de l'activation de la pompe Na/K qui serait électrogène.

Dans les conditions physiologiques anormales, c'est-à-dire dans les conditions où les ovocytes sont placés dans le milieu de Ringer modifié, le potentiel de membrane subit des variations dans la mesure où : d'une part le gradient électrochimique d'une espèce ionique pour laquelle la membrane ovocytaire est perméable, est modifié ; d'autre part, dans la mesure où une perméabilité ionique de repos est bloquée par son inhibiteur "spécifique". C'est ainsi que, dans nos conditions expérimentales, le milieu riche en K provoque une dépolarisation et que la substitution du K par du Cs s'avère sans effet alors qu'elle devrait entraîner une hyperpolarisation. De même, les ions TEA⁺ remplaçant les ions Na⁺ entraînent une diminution du potentiel de membrane comme le font aussi dans nos conditions les ions Cd²⁺ ajoutés à faible concentration (300 µM) dans le milieu de Ringer.

Comme cela est consigné dans le tableau 2, le milieu riche en K et pauvre en Na du fait du remplacement d'une partie de Na par du K dans la solution de Ringer (augmentation de 24 fois la concentration normale de K) entraîne une dépolarisation membranaire moyenne de 22 mV puisque le potentiel de membrane normal de $-50 \pm 5,3$ mV passe à $-28 \pm 3,7$ mV. L'amplitude de cette dépolarisation, bien qu'importante, est bien sûre moins ample que celle attendue si la membrane ovocytaire était exclusivement perméable aux ions K⁺. Il est possible malgré tout d'expliquer cette dépolarisation d'amplitude relativement faible, en invoquant avec WALLACE et STEINHARDT (1977) la contribution de la pompe Na/K au potentiel de membrane. Ainsi l'activation de la pompe due à l'augmentation de la concentration extracellulaire de K pourrait entraîner une augmentation du courant résultant sortant dépendant de la pompe et ainsi permettre de compenser la dépolarisation due à l'excès de K extracellulaire.

La perméabilité non exclusive aux ions K^+ rend compte également de la différence non significative observée entre le potentiel de membrane moyen en conditions de référence et celui obtenu en Ringer sans K, les ions K étant remplacés par des ions Cs^+ . Cela est tout à fait en accord avec ce qui est observé au niveau de nombreuses cellules où la substitution du K extracellulaire ne se traduit pas toujours par une hyperpolarisation mais parfois par une légère dépolarisation.

Nos résultats obtenus au niveau de l'ovocyte de *Rana esculenta* en ce qui concerne les effets des ions K^+ sont tout à fait conformes à ceux obtenus par TUPPER et MALOFF (1978), ZIEGLER et MORRIL (1977) chez *Rana pipiens* et par WALLACE et STEINHARDT (1977) chez *Xenopus*. Enfin, comme cela sera précisé ultérieurement, la valeur de la pile d'équilibre aux ions K^+ en milieu de Ringer c'est-à-dire en présence de 2 mM de K extracellulaire serait de - 110 mV. En effet, la valeur de cette pile d'équilibre aux ions K^+ est en théorie égale à celle du potentiel d'inversion du courant sortant porté par les ions K^+ . La valeur de ce dernier potentiel déterminée en milieu de Ringer est de - 110 mV (voir ci-après). Ainsi, la perméabilité aux ions K^+ est loin d'être exclusive puisque la différence $E_m - E_K$ est très éloignée de 0 mV ($- 50.10^{-3} + 110.10^{-3}$).

En présence de TEA, comme cela est indiqué au tableau 2, le potentiel de membrane diminue d'amplitude : en effet ce potentiel passe en moyenne de $- 50 \pm 5,3$ mV à $- 45,3 \pm 4,9$ mV. La dépolarisation, très significative, est de 5 mV. Cette dépolarisation peut être expliquée d'une

| Ringer normal | Ringer hyperpo- tassique | Ringer Cs | Ringer TEA | Ringer Cs Cd |
|---|-----------------------------|---------------|--------------|--------------|
| Potentiel de membrane (mV) (m ± SE) | - 50 ± 5,3 | - 51,8 ± 17,5 | - 45,3 ± 4,9 | - 43,3 ± 4,7 |
| Niveau de confiance calculée à partir du test de Student | 0,9963 | 0,6002 | 0,9661 | 0,9777 |

Tableau 2 : Valeur du potentiel de membrane en fonction de la composition ionique du milieu extracel-
lulaire.

Chaque valeur correspondant à un milieu anormal est comparée à celle de référence
(Ringer normal). La différence est d'autant plus significative que le niveau de
confiance est proche de 1.



part par le blocage de la conductance de la membrane aux ions K^+ et/ou par l'effet du milieu sans Na. Dans nos conditions expérimentales, les ions Na^+ du Ringer sont en effet remplacés par des ions TEA^+ . Ainsi, la diminution de la perméabilité potassique conduirait à faire moins tendre le potentiel de membrane vers E_K et/ou la suppression (en absence de Na) du courant électrogène produit normalement par la pompe Na/K, tendrait aussi à diminuer l'amplitude de E_m .

Enfin, l'effet du milieu Ringer-Cs-Cd utilisé, entraîne une dépolarisation de l'ordre de 7 mV par rapport aux conditions normales et même de 8,5 mV si l'on compare la valeur moyenne de E_m en Ringer Cs (- 51,8 mV) à celle en Ringer Cs-Cd (- 43,3 mV). Comme cela sera précisé ci-dessus, le Cd connu pour bloquer la conductance au Ca est aussi un inhibiteur de la conductance de la membrane aux protons (BARISH et BAUD, 1984). Dans ces conditions, si la régulation du pH intracellulaire dépend de l'activation de cette conductance comme le suggèrent ces derniers auteurs, il s'ensuit que lors du métabolisme cellulaire, la production d'ions H^+ tend à accroître l'activité intracellulaire de protons. Cette diminution du pH intracellulaire modifiant le mécanisme d'échange Na/H (WHITAKER et STEINHARDT, 1982) perturberait le fonctionnement de la pompe Na/K, déjà touché par l'absence de K extracellulaire (Ringer Cs). Dans la mesure où l'activité de cette pompe intervient dans la genèse du potentiel de membrane, son activité moindre pourrait rendre compte de la dépolarisation observée en Ringer Cs-Cd.

2/ Résistance membranaire

La résistance membranaire mesurée dans nos conditions expérimentales, devrait correspondre uniquement à celle de la membrane plasmique ovocytaire puisque les ovocytes sont "défolliculés" suite à leur traitement préalable par la collagénase.

Dans les conditions de référence, c'est-à-dire pour des ovocytes placés dans le Ringer, la résistance moyenne est de $461 \pm 170 \text{ K}\Omega$. Si l'on prend comme surface membranaire des ovocytes, celle calculée à partir de leur diamètre (1 mm), sa valeur sera de $3,1 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$. Dans ces conditions, la résistance spécifique moyenne en Ringer sera de $14,3 \pm 5,3 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($461 \pm 170 \text{ K}\Omega \times 3,1 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$). Cette valeur est comparable à celle donnée par VILAIN et al. (1971) en ce qui concerne les ovocytes de même diamètre d'un amphibien urodèle : *Pleurodeles Waltlii Michah*, ainsi qu'à celle donnée par MAENO (1959) pour les ovocytes de *Bufo bufo*.

Lorsque le milieu est enrichi en ions K^+ (24 fois la concentration normale), à la dépolarisation observée (voir ci-dessus) est associée une chute de la résistance de membrane. Cette chute atteint en moyenne 70 % de la valeur normale puisque la résistance de membrane spécifique passe de $14,3 \pm 5,3 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$ à $4,2 \pm 0,46 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$. Cette diminution de résistance est en accord avec l'accroissement de la perméabilité aux ions K^+ généralement observée sous l'effet des milieux riches en K.

3/ Capacité membranaire

La valeur de la capacité membranaire à partir de l'enregistrement du courant capacitif produit lors d'une variation rectangulaire de potentiel imposé (V), peut être calculée en évaluant la constante de temps de décroissance du courant capacitif. L'équation du courant capacitif en fonction du temps, est en effet la suivante :

$$I_c = I_0 e^{-t/\tau}$$

Dans cette expression, I_0 est la valeur instantanée du courant, τ est égale au produit de la capacité membranaire, c_m , par la résistance d'accès (r_{acc}). Sachant que r_{acc} est égale à V/I_0 , la capacité, c_m , est donc égale à :

$$c_m = \tau / r_{acc}$$

τ peut être déterminée graphiquement, elle correspond au temps pour lequel le courant I_c décroît de I_0 à $I_0 \cdot e^{-1}$.

Dans le cas des ovocytes de *Rana esculenta*, la valeur de la capacité membranaire trouvée dans nos conditions est en moyenne de $3,22 \cdot 10^{-7}$ F, ce qui correspond à une capacité membranaire spécifique de $10,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (en ne tenant compte que de la surface de la sphère). Cette valeur est voisine de celle obtenue chez *Bufo bufo* par MAENO (1959) et chez *Xenopus Laevis* par KANNO et LOEWENSTEIN (1963). En partant du principe que toutes les membranes

biologiques présentent une valeur de capacité de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, la surface réelle de la membrane ovocytaire de *Rana esculenta* serait donc de 10 fois supérieure à celle évaluée uniquement à partir de la valeur du diamètre ($4 \pi R^2$). Ce facteur multiplicateur de 10 est compris entre celui calculé par DICK et al. (1969) chez l'ovocyte de *Bufo bufo* (6 fois) et celui évalué par KADO et al. (1981) chez l'ovocyte de *Xenopus* (20 fois).

II - COURANTS ET CONDUCTANCES MEMBRANAIRES

A/ Courant entrant activé lors des hyperpolarisations

Comme au niveau des ovocytes d'étoile de mer, dans des conditions normales, c'est-à-dire pour des ovocytes de *Rana* placés dans le liquide de Ringer, il apparaît pour les hyperpolarisations, comme le révèle la figure 3A, un courant entrant qui varie en fonction du temps et du potentiel. Ce courant, mis en évidence pour la première fois par HAGIWARA et al., (1976) sur les ovocytes d'étoile de mer, est transporté par les ions K^+ . En effet, ces auteurs montrent que la suppression du K externe et son remplacement par du Cs, conduit comme sur les fibres musculaires de vertébrés, à la disparition du courant entrant de rectification. Par contre, si le TEA bloque le courant de rectification de sens entrant sur les fibres musculaires de grenouille (STANFIELD, 1970), il n'a aucun effet sur celui de l'oeuf d'étoile de mer (HAGIWARA et al. 1976). De même, comme cela est illustré à la figure 3, cette rectification est aussi présente au niveau de l'ovocyte de *Rana esculenta*. Pour ce qui est de la nature ionique de

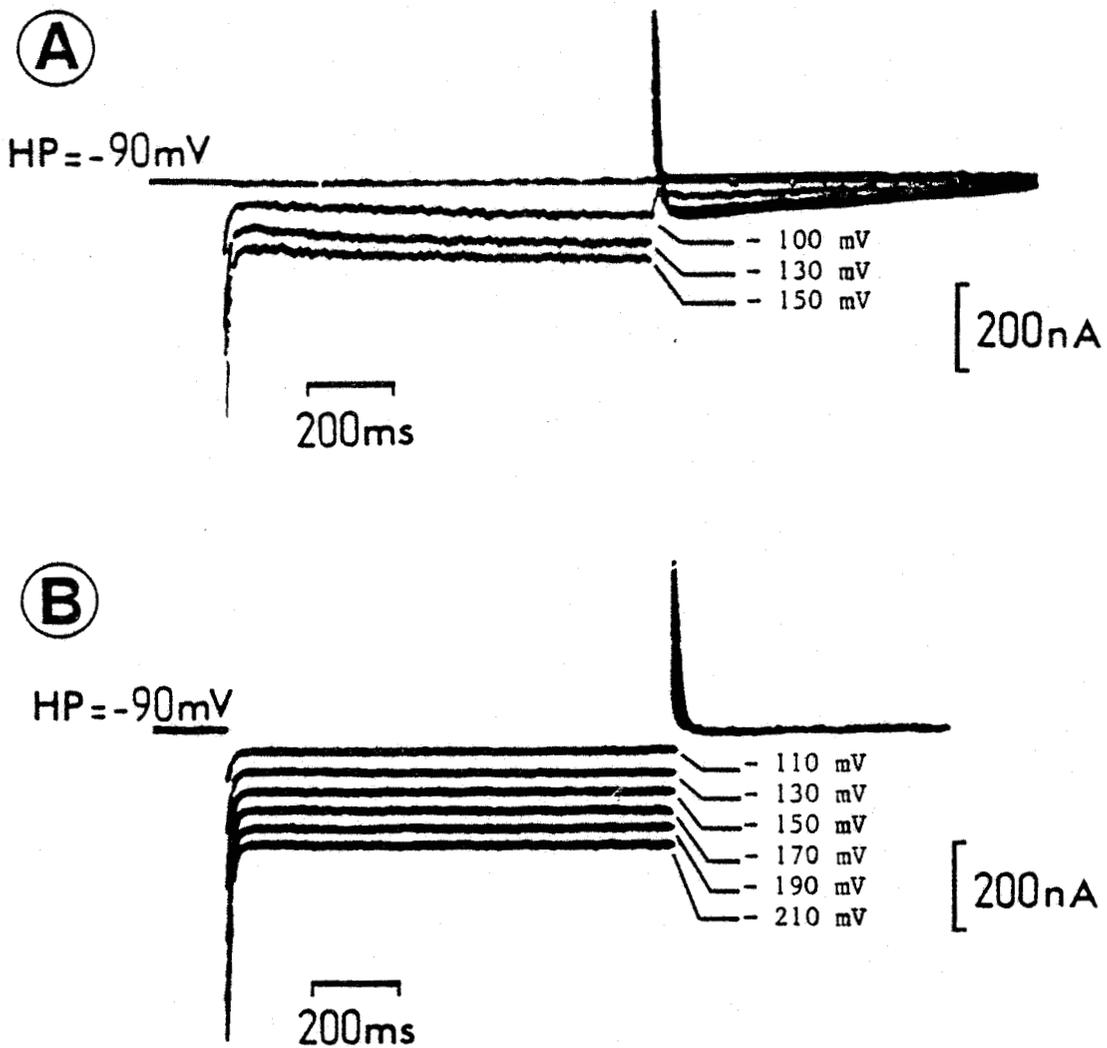


Figure 3

Courant membranaire entrant activé par des hyperpolarisations à partir d'un HP de - 90 mV. Pour chaque tracé de courant, est indiquée la valeur de potentiel auquel est portée la membrane. Tracés obtenus dans les conditions ioniques de référence (Ringer) en A ; tracés en Ringer-Cs en B.

ce courant, il semble comme chez l'oeuf d'étoile de mer, qu'il soit porté par les ions K^+ . En effet, comme le montre la figure 3B, cette rectification est réduite voire même abolie en milieu sans K en présence de 20 mM de Cl Cs (Ringer Cs). Cependant à l'inverse de ce qui se passe chez les oeufs d'étoile de mer, le TEA n'est pas sans effet, puisqu'il exerce un effet inhibiteur sur la rectification dans le sens entrant de l'ovocyte de *Rana esculenta* (Résultats non illustrés).

B/ Courants sortants activés lors de dépolarisations et conductances correspondantes

1/ Etude du courant sortant global

Dans les conditions ioniques de référence, lorsque les ovocytes sont dépolarisés à différents niveaux de potentiel, un courant sortant dépendant du potentiel et du temps apparaît. Les figures 4A et 4B montrent l'évolution de ce courant membranaire en fonction du temps pour différentes valeurs de dépolarisations à partir d'un potentiel de départ (Holding potential, HP) de - 90 mV. Les dépolarisations, comme le montrent les figures, permettent l'activation d'un courant sortant qui croît en fonction du temps jusqu'à une valeur maximale. Cette activation n'est pas suivie d'une inactivation puisque le courant dynamique sortant ayant atteint sa valeur maximale, la conserve par la suite, durant toute la fin de l'impulsion dépolarisante. Ce courant sortant est en fait un courant complexe résultant de deux composantes ioniques qui peuvent être différenciées par leur niveau d'activation et leur potentiel d'inversion. En effet, quand la membrane est

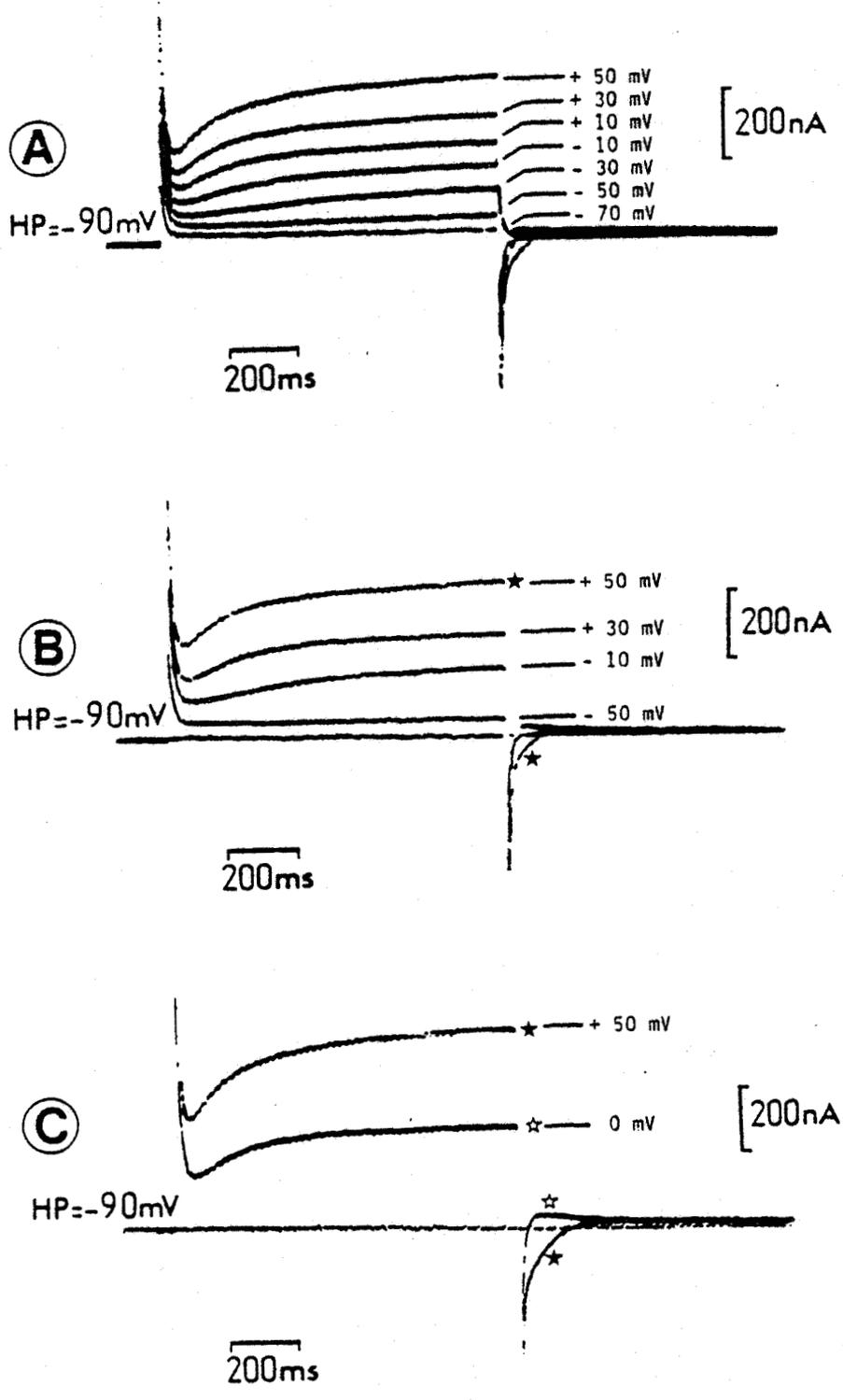


Figure 4

Courants sortants activés par des dépolarisations à partir d'un HP de - 90 mV (pour chaque tracé de courant est indiquée la valeur de potentiel correspondant) en milieu de Ringer normal (pH 7,4). A chaque courant de queue marqué par un astérisque correspond le courant sortant marqué également par un astérisque.

portée à un potentiel de -10 mV, une première composante s'active, atteint sa valeur maximale puis se désactive après le retour du potentiel à la valeur HP de départ (-90 mV) ; ce courant de désactivation se traduit par la présence d'un courant de queue de sens sortant variant exponentiellement avec le temps (courant positif). La deuxième composante s'active pour des potentiels positifs et le courant de queue correspondant lors du retour à la même valeur de HP est par contre de sens entrant (figures 4B et 4C).

En fait, lors du retour du potentiel à la valeur HP de départ, le courant se désactive et le signe de ce courant, appelé courant de queue, correspond à celui du gradient électrochimique ($HP - E_x$), E_x étant le potentiel d'inversion du courant qui s'est activé lors de la dépolarisation. Lors de l'activation d'une seule conductance, le potentiel d'inversion correspond en théorie au potentiel d'équilibre des ions qui portent ce courant et par conséquent la détermination du potentiel d'inversion renseigne sur la nature ionique de la conductance activée lors de la dépolarisation.

Comme le montre la figure $5A_1$, partant d'un HP de -90 mV, une dépolarisation, relativement faible, amenant la membrane à un potentiel de 0 mV, ne permet l'activation que de la première composante du courant sortant. Dans ces conditions, le courant de queue variant exponentiellement en fonction du temps est de sens sortant lors du retour du potentiel à la valeur de -90 mV alors qu'il s'annule par contre quand le potentiel est amené à -110 mV. Ce potentiel de -110 mV correspond donc au potentiel d'inversion du courant qui s'est activé lors de la dépolarisation. Comme le montre la figure $5A_2$, partant d'un HP de -110 mV, des dépolarisations

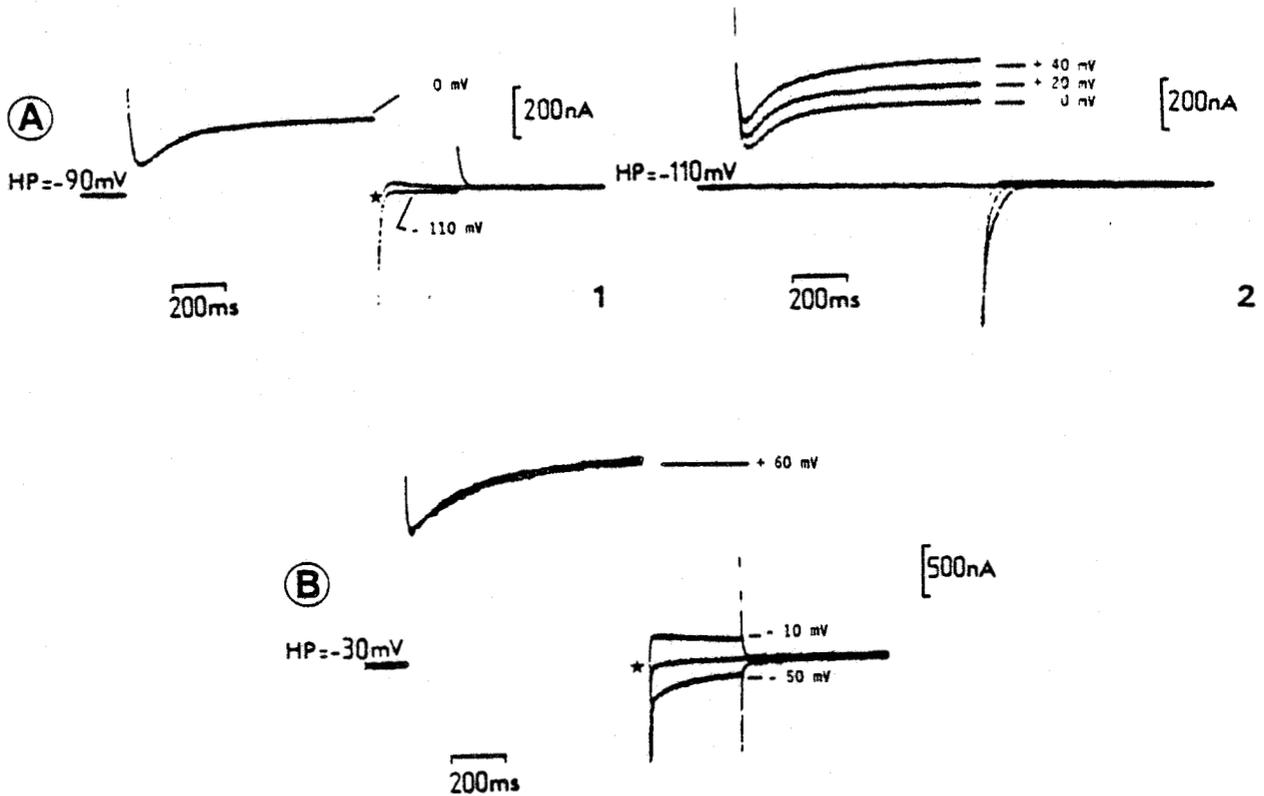


Figure 5

Détermination du potentiel d'inversion du courant sortant en milieu de Ringer normal (pH 7,4). Potentiel d'inversion de la première composante (voir texte) déterminé en conditions de double impulsion, $E_{rev} = -110$ mV (tracés A₁) ; à ce potentiel, le courant de queue marqué par un astérisque est nul. Evolution du courant sortant global pour trois dépolarisations à partir d'un HP de -110 mV, les courants de queue sont dans ce cas tous de sens entrant (tracés A₂). Détermination du potentiel d'inversion du courant sortant global en conditions de double impulsion ; le courant de queue marqué par un astérisque, s'annule pour un potentiel de -30 mV (tracés B).

amenant la membrane à des potentiels permettant l'activation des deux composantes, donnent un courant sortant global qui s'active au cours du temps mais dont le courant de queue correspondant, lors du retour à la valeur HP de départ (-110 mV) est de sens entrant; le courant de désactivation correspondant à la première composante étant nul.

La figure 5B montre qu'une ample dépolarisation portant la membrane à un potentiel de 60 mV à partir d'une valeur d'HP de -30 mV permet le développement d'un ample courant sortant constitué des deux composantes. Comme le montre la figure, lors du retour à un potentiel HP de -50 , -30 ou -10 mV, ce courant sortant se désactive permettant cependant de déterminer la valeur du "potentiel d'inversion" des deux composantes, cette valeur est de l'ordre de -30 mV. Ceci indique que la deuxième composante (montrée plus loin être portée par les ions H^+) domine largement la première dont le potentiel d'inversion, déterminé ci-dessus, est de l'ordre de -110 mV (fig. 5A). Cette relaxation de la première composante correspond selon toute vraisemblance à la désactivation d'une conductance potassique, dans la mesure où une augmentation de la concentration externe en K. fait varier le potentiel d'inversion du courant sortant correspondant comme le prévoit la relation de Nernst en ce qui concerne le potentiel d'équilibre E_K . En effet, quand une variation correspondant à une augmentation de 24 fois la concentration extracellulaire normale de K est réalisée, le potentiel d'inversion correspondant à la première composante devrait passer de -110 mV à -30 mV. Dans ces conditions, des dépolarisations activant la conductance aux ions K^+ à partir d'une valeur de HP de -30 mV, doivent entraîner l'annulation de la composante du courant de queue porté par les ions K^+ , lors du retour à cette valeur particulière de HP. La figure 6A montre en effet

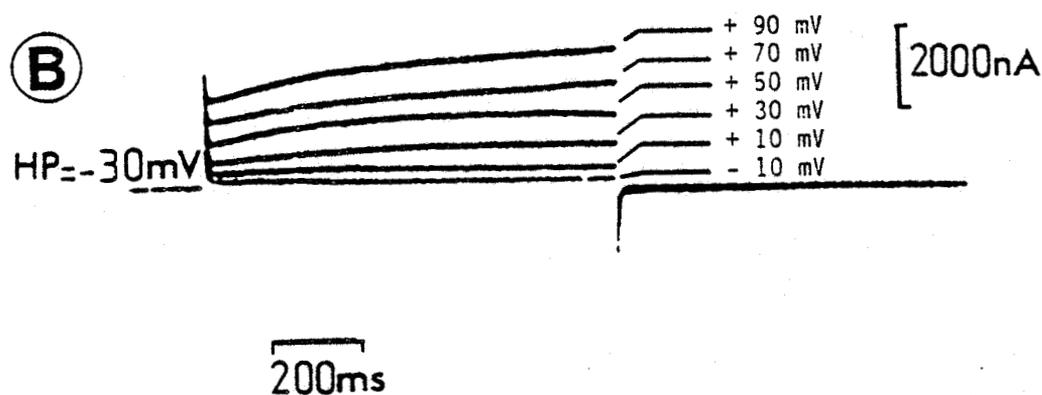
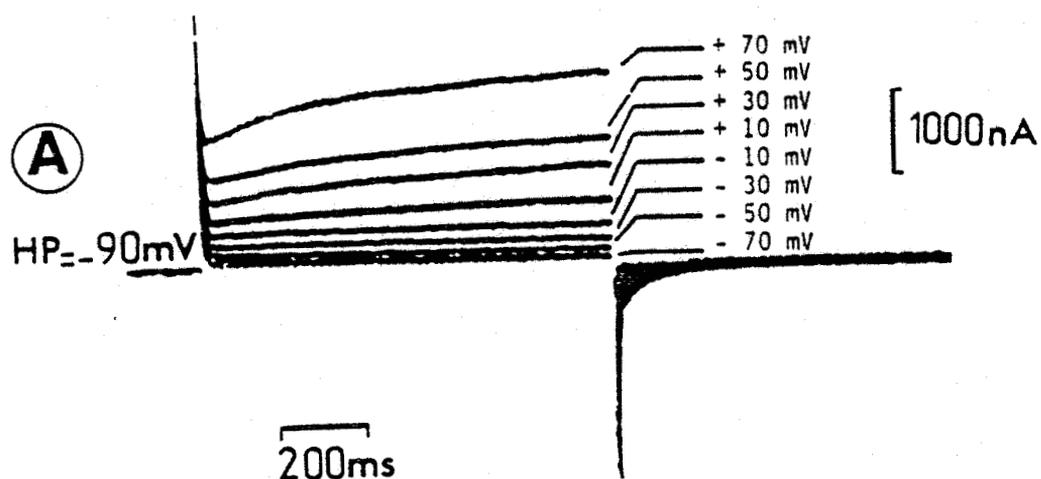


Figure 6

Evolution du courant membranaire sortant en milieu hyperpotassique (24 fois la concentration normale en K) lors de dépolarisations à partir d'un HP de - 90 mV, (A) et d'un HP de - 30 mV, (B) ; au potentiel de - 30 mV, le courant de queue est nul quelle que soit l'amplitude de la dépolarisation activant le courant sortant.

que d'amples dépolarisations appliquées à la membrane à partir d'une valeur d'HP de - 90 mV, entraînent globalement l'apparition d'un courant de queue de sens entrant. Par contre, si ces dépolarisations sont réalisées à partir d'une valeur de HP de - 30 mV, ce courant de queue est nul (fig. 6B).

Enfin, les courbes courant-potentiel présentées à la figure 7, obtenues en conditions ioniques normales (Ringer) se déplaçant en milieu riche en K dans le sens des dépolarisations, traduisent bien la nature potassique du courant sortant activé lors de faibles dépolarisations c'est à dire quand le potentiel est amené à un niveau inférieur ou égal à 0 mV ; en effet au delà, la deuxième composante s'active (voir fig. 4).

2/ Analyse de g_K

a - Détermination du nombre de particules impliquées dans l'ouverture des canaux aux ions K^+

Il est possible à partir des travaux d'Hodgkin et Huxley (1952) de déterminer les paramètres de l'équation qui traduit l'évolution de la conductance en fonction du temps et aussi de connaître le nombre de particules impliquées dans l'ouverture des canaux par où passe le courant sortant porté par les ions K^+ . D'après les données d'Hodgkin et Huxley (1952), l'équation $g_K = f(t)$ est la suivante :

$$g_K = \bar{g}_K \left[n_0 + (n_\infty - n_0) (1 - e^{-t/\tau}) \right]^x \quad (1)$$

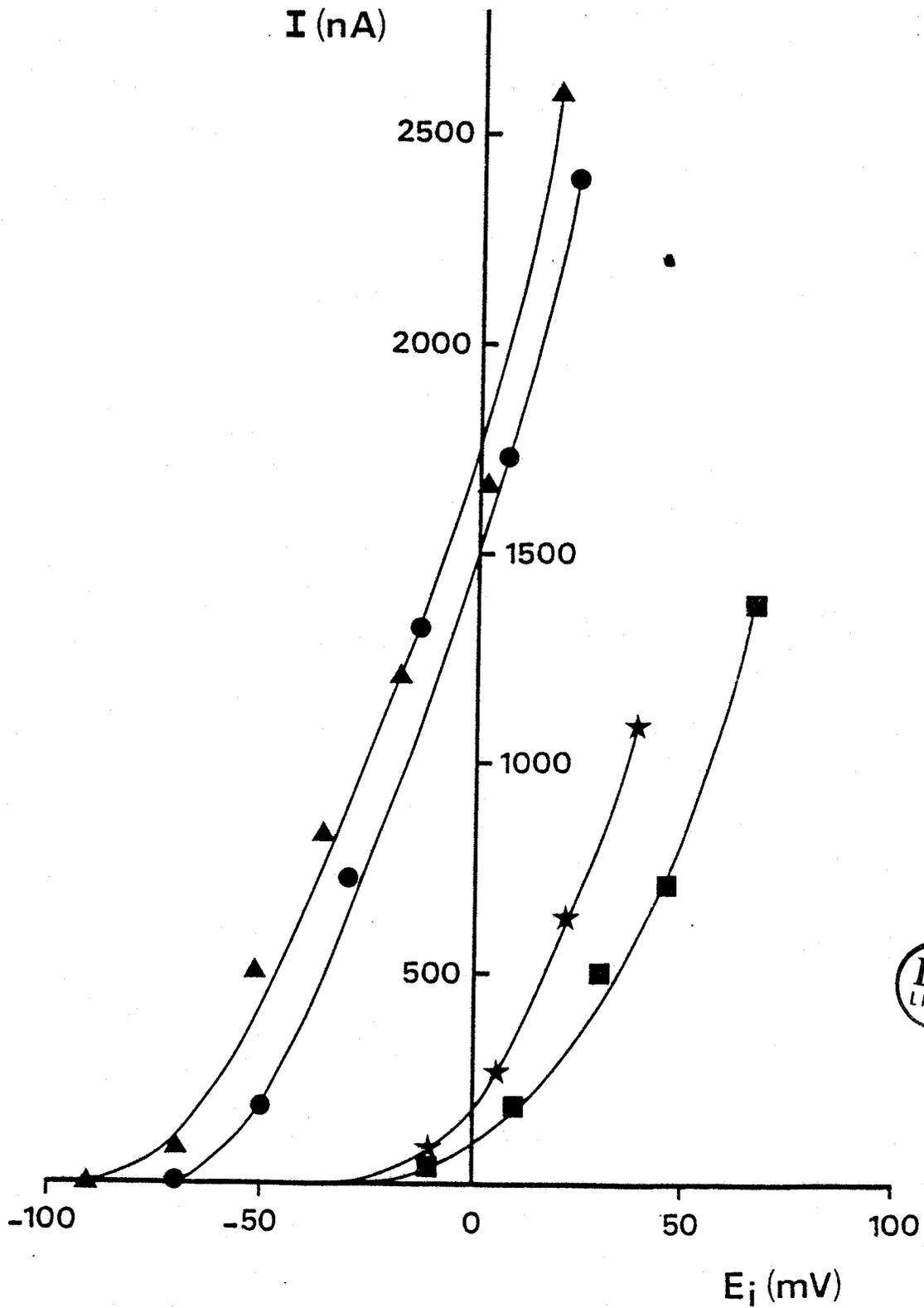


Figure 7

Relations courant-potential établies en fin d'impulsion (1s) après soustraction du courant de fuite, en Ringer normal (▲, ●) et en Ringer hyperpotassique (★, ■). Le milieu riche en K correspond à 24 fois la concentration normale en K.

n_0 est la valeur de la variable d'activation au potentiel HP, n_∞ est la valeur stationnaire de n en fin de transformation d'un certain nombre de sites de l'état β (non disponibles) à l'état α (disponibles) des canaux potassiques. \bar{g}_K est la valeur maximale de conductance correspondant à la valeur de $n_\infty^x = 1$. Au potentiel HP de - 90 mV, n_0 peut être considérée comme négligeable ($n_0 = 0$), puisque le seuil de potentiel d'activation de g_K est $> \bar{a} - 50$ mV (voir figure 4), valeur donc éloignée de - 90 mV. Dans ces conditions, en prenant $n_0 = 0$, l'équation (1) se simplifie et devient :

$$g_K = \bar{g}_K \left[n_\infty (1 - e^{-t/\tau}) \right]^x$$

d'où

$$g_K = \bar{g}_K n_\infty^x (1 - e^{-t/\tau})^x$$

en posant

$$\bar{g}_K \cdot n_\infty^x = g_{K_\infty}$$

il vient

$$g_K = g_{K_\infty} (1 - e^{-t/\tau})^x$$

comme

$$g_K = I_K / (E_i - E_K)$$

il s'ensuit :

$$I_K = I_{K_\infty} (1 - e^{-t/\tau})^x \quad (2)$$

$I_{K_{\infty}}$ étant la valeur maximale atteinte par le courant I_K pour une dépolarisation donnée (E_i).

A partir de l'équation (2) il peut être écrit

$$1 - (I_K / I_{K_{\infty}})^{1/x} = e^{-t/\tau}$$

d'où

$$\text{Log} \left[1 - (I_K / I_{K_{\infty}})^{1/x} \right] = -t/\tau$$

Cette relation satisfait à l'équation de la forme $y = -ax$, avec $y = \text{Log} \left[1 - (I_K / I_{K_{\infty}})^{1/x} \right]$ et $x = t$; l'ordonnée à l'origine étant égale à 0.

En partant des couples de valeurs (t, I_K) , on constate que l'ordonnée est très proche de 0 quand la valeur 4 est donnée à x ; pour $x < 4$, l'ordonnée est positive et pour $x > 4$, elle est négative. De plus, le coefficient de corrélation r est le plus proche de 1 pour $x = 4$. Ce résultat implique que quatre particules sont requises lors de l'ouverture du canal potassique de la membrane ovocytaire de *Rana esculenta*, ce qui est en accord avec les études relatives à la conductance aux ions K^+ , conductance décrite sur de nombreuses structures excitables.

b - Calcul de la conductance maximale aux ions K^+

La conductance au K , g_K , peut être calculée à partir de l'équation suivante :

$$I_K = g_K (E_i - E_K) \quad (3)$$

où I_K représente l'intensité du courant pour un potentiel donné à un instant t , E_i le potentiel imposé et E_K le potentiel de la pile d'équilibre aux ions K^+ (en théorie E_K est égale au potentiel d'inversion de I_K).

A partir d'un HP de - 90 mV, une dépolarisation de 90 mV d'amplitude (figure 8) déclenche l'activation du courant I_K , ce courant s'active au cours du temps pour atteindre une valeur maximale I_{K_∞} puis se désactive lors du retour au potentiel HP ; le courant de désactivation se traduit par un courant de queue qui est de sens sortant. Une dépolarisation plus ample (100 mV d'amplitude), déclenche un courant I_K plus grand mais dont la désactivation correspond à un courant de queue identique au précédent. Dans ces dernières conditions ($E_i = 10$ mV par rapport à $E_i = 0$ mV), l'augmentation du courant I_K est donc uniquement due à l'augmentation du gradient électrochimique ($E_i - E_K$). Ceci implique qu'au potentiel $E_i = 0$ mV, l'activation maximale de g_K est déjà atteinte. L'équation (3) appliquée aux deux niveaux de potentiel donne :

$$I_{K_\infty} (10 \text{ mV}) = g_{K_\infty} (10 \text{ mV}) (10 \cdot 10^{-3} - E_K)$$

$$I_{K_\infty} (0 \text{ mV}) = g_{K_\infty} (0 \text{ mV}) (0 \cdot 10^{-3} - E_K)$$

De ces deux équations précédentes, on tire :

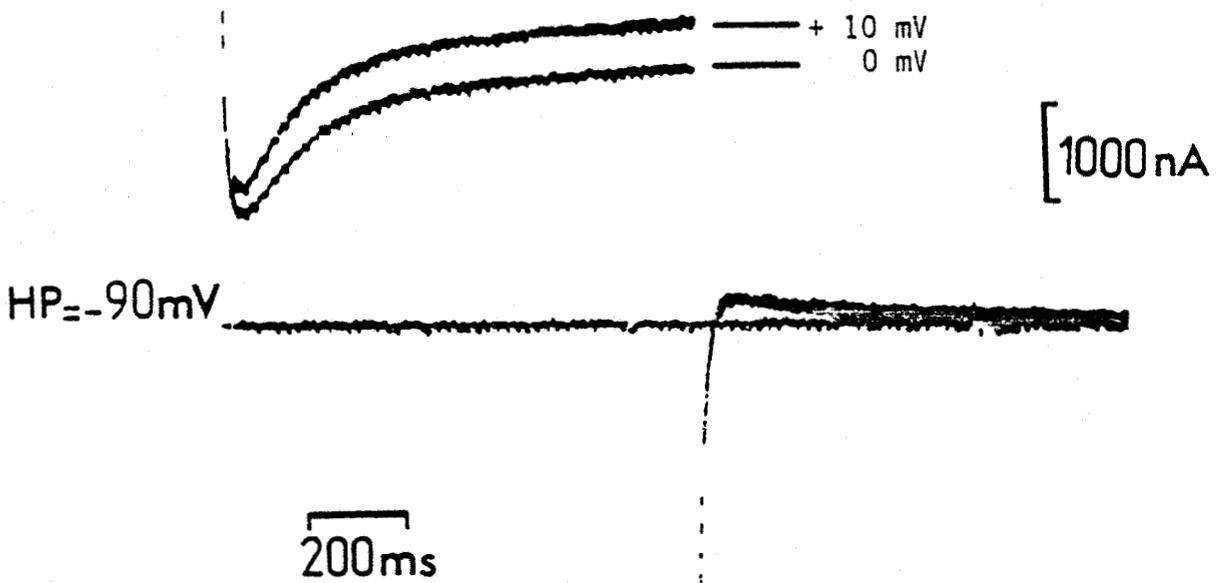


Figure 8

Evolution du courant sortant et du courant de queue correspondant, pour deux dépolarisations ($E_i = 0$ mV et $E_i = 10$ mV). Lors du retour à la valeur de HP, le courant de queue suite aux deux dépolarisations est identique.

$$I_{K_{\infty}}(10 \text{ mV}) - I_{K_{\infty}}(0 \text{ mV}) = g_{K_{\infty}}(10 \text{ mV}) (10 \cdot 10^{-3} - E_K) - g_{K_{\infty}}(0 \text{ mV}) (0 \cdot 10^{-3} - E_K)$$

or

$$g_{K_{\infty}}(10 \text{ mV}) = g_{K_{\infty}}(0 \text{ mV}) = \bar{g}_K$$

d'où

$$I_{K_{\infty}}(10 \text{ mV}) - I_{K_{\infty}}(0 \text{ mV}) = \bar{g}_K (10 \cdot 10^{-3} - 0 \cdot 10^{-3})$$

ainsi

$$\bar{g}_K = \frac{I_{K_{\infty}}(10 \text{ mV}) - I_{K_{\infty}}(0 \text{ mV})}{10 \cdot 10^{-3}}$$

Des valeurs de courant $I_{K_{\infty}}$ déterminées pour les deux niveaux de potentiel ($E_i = 0 \text{ mV}$ et $E_i = 10 \text{ mV}$), la valeur moyenne calculée de \bar{g}_K est de $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ S}$.

3/ Mise en évidence de la deuxième composante de courant et de la conductance correspondante après dissection du courant sortant global.

L'étude de la deuxième composante du courant sortant ne peut être analysée que si la composante potassique est supprimée, puisque dans les conditions ioniques normales (Ringer), à partir d'un seuil de 0 mV , cette deuxième composante s'active et se trouve ainsi plus ou moins associée au courant I_K .

La contamination de la deuxième composante par le K est abolie en milieu TEA, le TEA inhibant g_K . En effet, dans ces conditions, comme le montre la figure 10, les courbes courant-potentiel réalisées à partir des tracés du courant membranaire pour différents niveaux de potentiel (figure 9A) se déplacent dans le sens des dépolarisations. Ce déplacement est dû à la suppression, voire la forte réduction du courant I_K . Aussi, le courant sortant résultant ne s'active qu'à partir d'une valeur seuil de potentiel proche de 0 mV ; ce seuil correspond au seuil d'activation d'une conductance aux ions H^+ (g_H) comme cela est démontré ci-dessous. Un résultat identique (inhibition de g_K) est obtenu si au milieu de Ringer sans K est ajouté 20 mM de CsCl. Comme le montrent les tracés de la figure 9B, partant d'un HP de - 90 mV, un courant sortant dépendant du temps et du potentiel n'est bien activé qu'à partir d'un potentiel seuil de 0 mV. En effet, des dépolarisations d'amplitude inférieure à 90 mV, ne se traduisent au niveau du courant membranaire, que par la seule existence d'un courant de fuite dont l'amplitude ne dépend que du potentiel.

En conclusion, en milieu de Ringer sans K contenant 20 mM de CsCl ou en présence de 120 mM de TEA Cl remplaçant le NaCl du Ringer, il est possible d'étudier correctement cette 2ème composante de courant sortant. Cette composante, comme cela est démontré ci-dessous, correspond à un courant sortant porté par les ions H^+ .

4/ Analyse de g_H

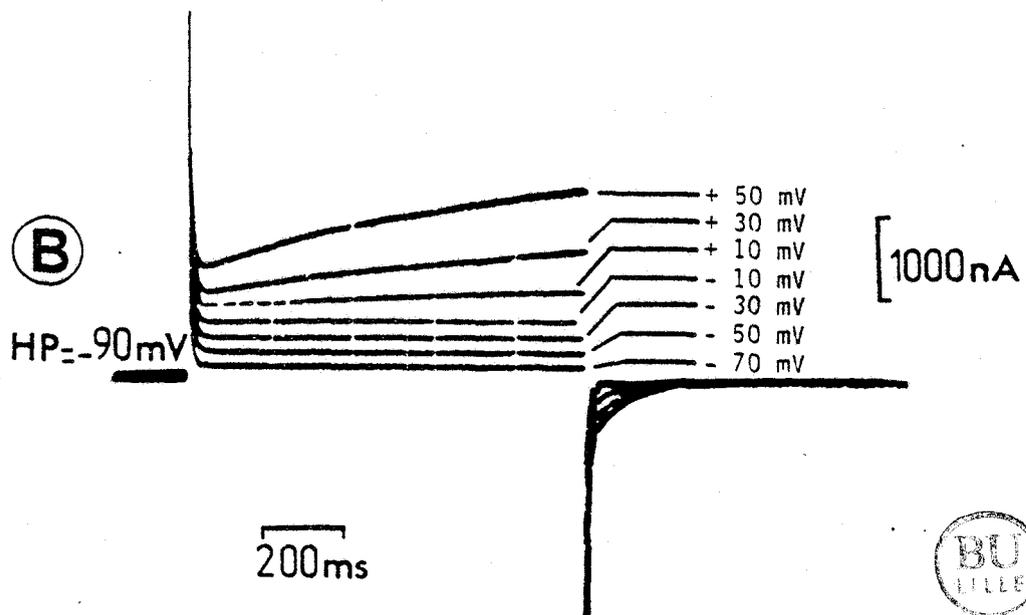
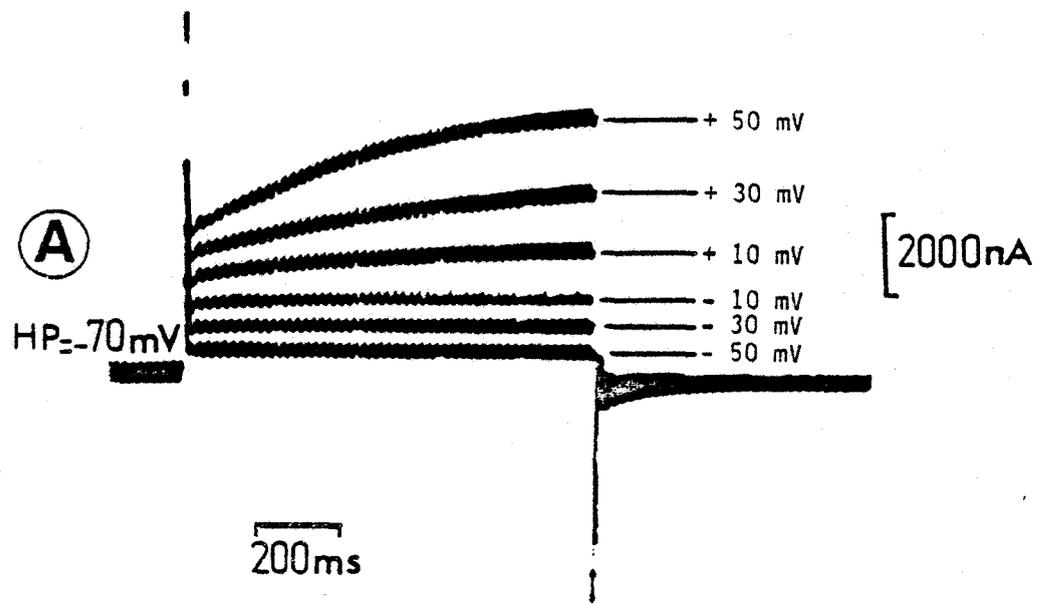


Figure 9

Evolution du courant sortant membranaire en milieu de Ringer-TEA (pH 7,4), tracés (A) ; et en milieu de Ringer-Cs, tracés (B) .

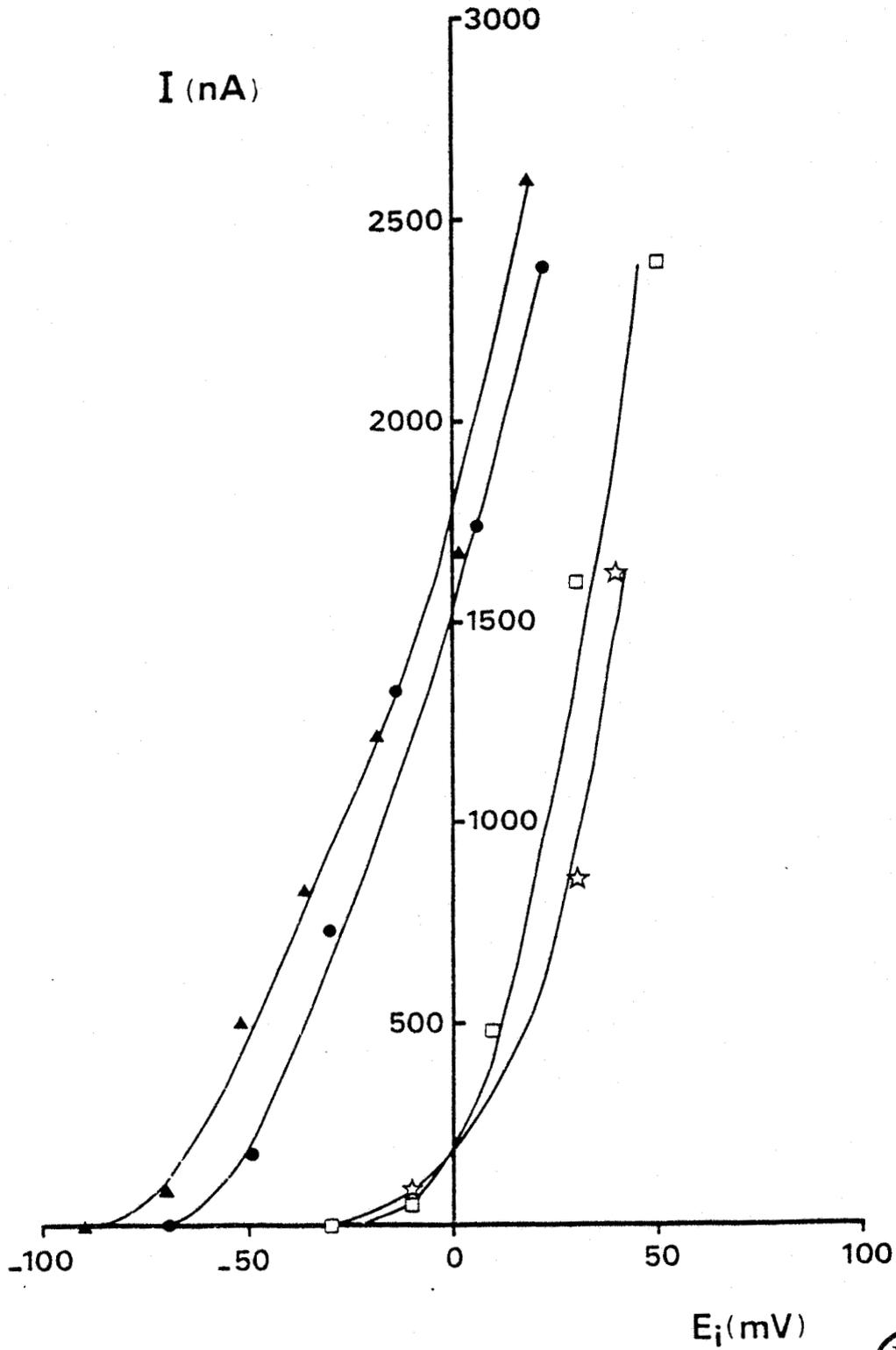


Figure 10

Relation courant-potentiel établie en fin d'impulsion (1 s) après soustraction du courant de fuite en Ringer normal (▲, ●) et en Ringer-TEA (□, ☆).

a - Sélectivité des canaux ioniques par où passe le
courant dynamique sortant I_H

La figure 11 montre des courants de queue enregistrés suite à une ample dépolarisation d'une durée d'environ 1 s, pour quatre valeurs de pH externe en milieu de Ringer-TEA. Le potentiel d'inversion correspondant à un courant de queue nul (marqué par un astérisque) se déplace dans le sens des dépolarisations avec l'augmentation de la concentration externe en ions H^+ c'est-à-dire avec la diminution du pH externe. La figure 12 illustre ces résultats, elle montre la relation linéaire liant le potentiel d'inversion (E_{rev}) de I_H au pH. La variation de E_{rev} atteint une valeur moyenne de 55,7 mV lors d'une variation d'une unité du pH externe. Cette valeur, très proche de 58 mV, montre que les canaux par où passent les ions H^+ sont très sélectifs. Ainsi la deuxième composante de courant sortant, activée lors d'amples dépolarisations, est très fortement voire totalement portée par les ions H^+ . Comme le potentiel d'inversion de I_H pour une valeur normale de pH (7,4) est en moyenne de $-30,4 \pm 6,2$ mV, cela donne pour le pH intracellulaire calculé d'après l'équation de Nernst une valeur moyenne de $6,87 \pm 0,10$; cette valeur est proche de celle donnée par de nombreux auteurs. En effet, le pH intracellulaire déterminé par BARISH et BAUD (1984) est de $7,2 \pm 0,05$ (pH externe de 7,4) sur les ovocytes d'*Ambystoma* ; celui de *Xenopus* est de $7,4 \pm 0,03$ pour une valeur de pH externe de 7,8 (LEE et STEINHARDT, 1977) et de $7,1 \pm 0,17$ pour un pH externe de 7,6 (HOULE et WASSERMAN, 1983). Cette valeur moyenne de $-30,4$ mV pour le potentiel d'inversion du courant de protons à un pH externe de 7,4, est confortée par la détermination du potentiel d'inversion du courant sortant activé par une ample dépolarisation en milieu riche en K. En effet, la figure 13 montre qu'effectivement le potentiel d'inversion est de -30 mV ; dans ces conditions ioniques parti-

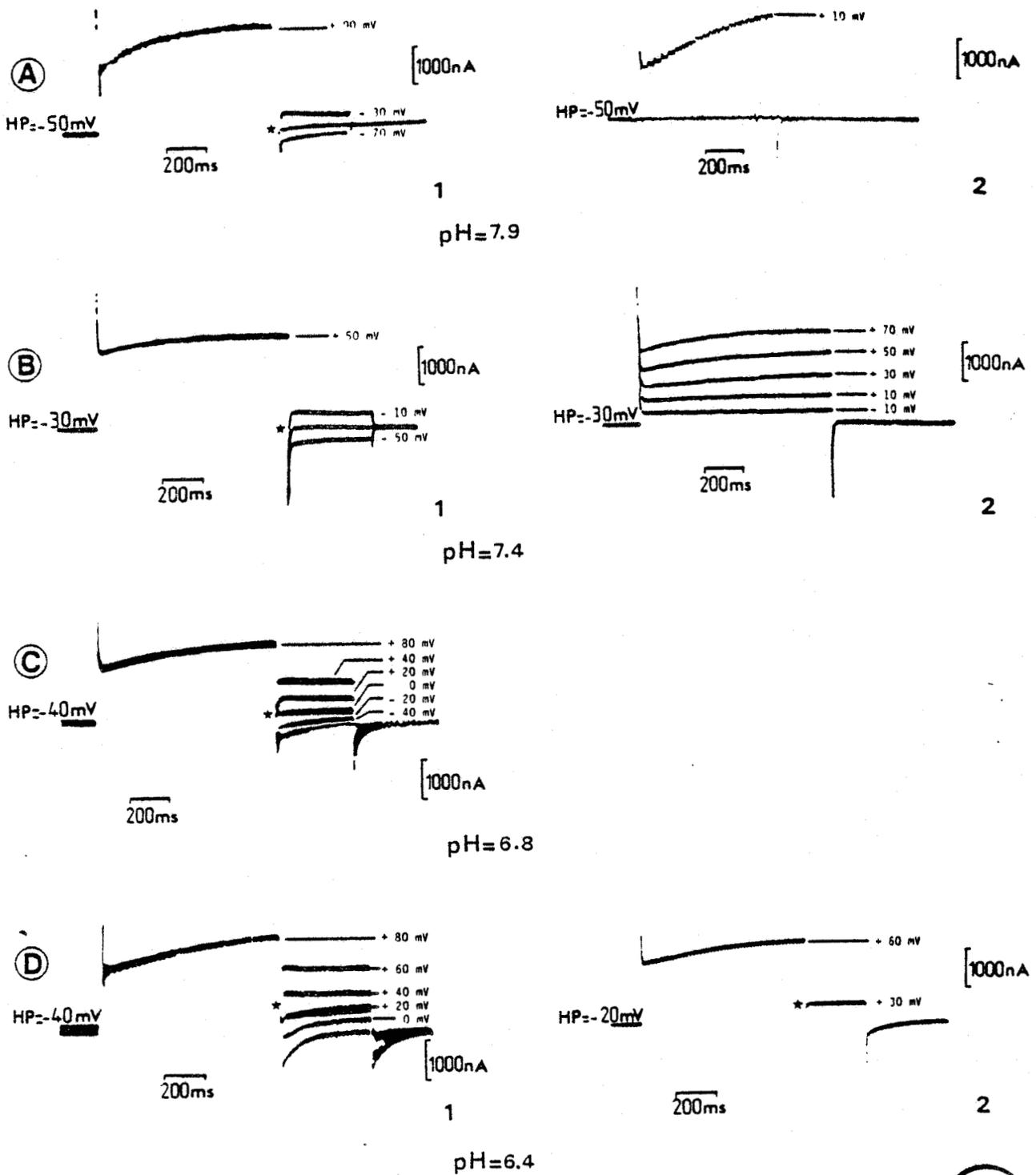


Figure 11

Détermination du potentiel d'inversion en milieu de Ringer-TEA pour 4 valeurs de pH externe. pH = 7,9, $E_{rev} = -50$ mV (A) ; pH = 7,4, $E_{rev} = -30$ mV (B) ; pH = 6,8, $E_{rev} = 0$ mV (C) ; pH = 6,4, $E_{rev} = +30$ mV (D).

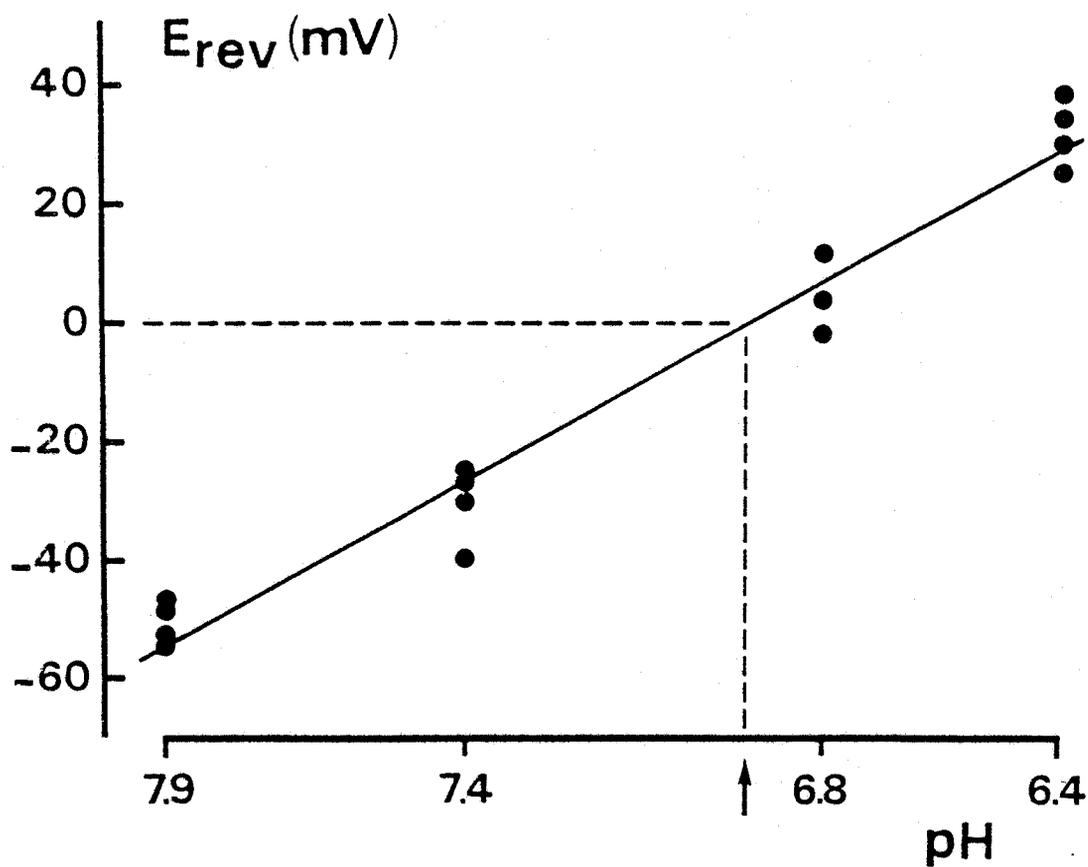


Figure 12

Relation linéaire liant le potentiel d'inversion du courant de protons (E_{rev}) au pH externe. Le coefficient de corrélation de la droite de régression est de 0,994. E_{rev} est nul pour un pH de 6,93 (indiqué par la flèche), ce pH correspond au pH intracellulaire.



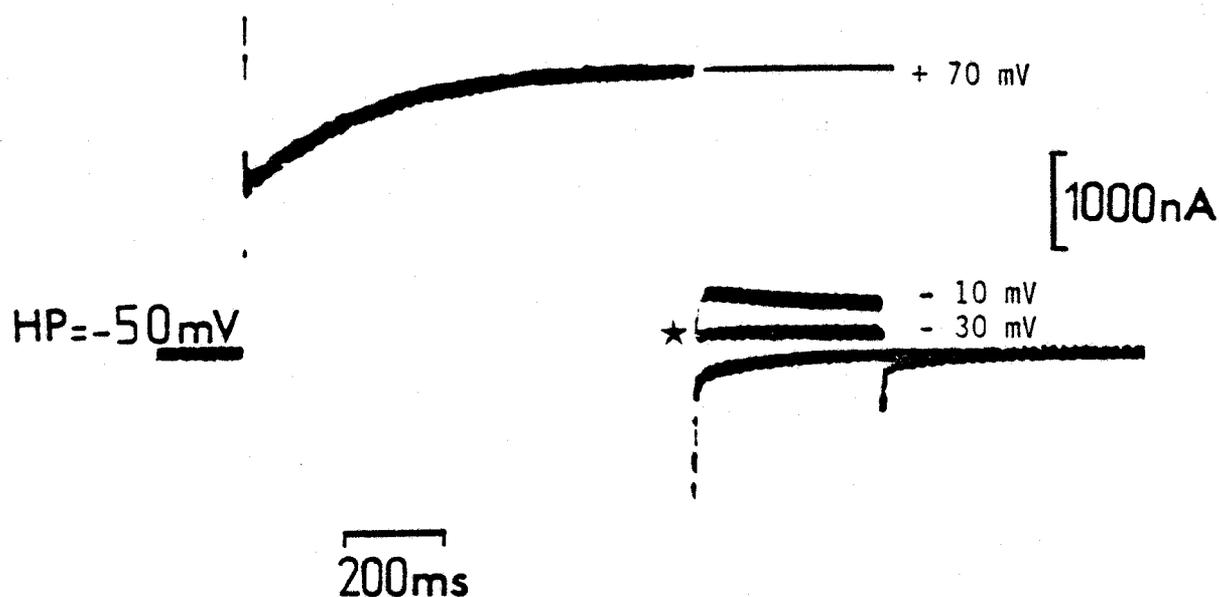


Figure 13

Potentiel d'inversion du courant sortant global activé par une dépolarisation de 120 mV d'amplitude ($E_i = +70\text{ mV}$) en milieu de Ringer hyperpotassique (24 fois la concentration normale en K, $E_{rev} = -30\text{ mV}$, voir texte). Au courant de queue nul marqué par un astérisque correspond une valeur de potentiel (E_{rev}) de -30 mV .

culières, le potentiel d'inversion du courant sortant de K étant de - 30 mV (voir figure 6). Comme à - 30 mV le courant de queue est nul, cela implique que le potentiel d'inversion de I_H est aussi égal à - 30 mV.

Enfin, la forte sélectivité ionique des canaux aux ions H^+ , démontrée antérieurement par une variation du potentiel d'inversion proche de la variation de la pile d'équilibre aux ions H^+ (55,7 mV au lieu de 58 mV comme le prévoit l'équation de Nernst lors d'une variation d'une unité de pH externe) est confortée par les expériences dont l'illustration est donnée à la figure 14. En milieu isotonique d'acétate de Ca et donc en absence de Cl, K et Na, le potentiel d'inversion du courant sortant activé par d'amples dépolarisations ne dépend que de la concentration externe en protons. A un pH de 7,4 pour une valeur de HP de - 30 mV (présumée égale au potentiel d'inversion de I_H), en dépit d'amples activations du courant sortant, les courants de queue correspondants sont inexistants (fig. 14 A) ; cela s'explique si à - 30 mV le gradient électrochimique pour les ions H^+ est nul. Pour une même valeur de pH de 7,4, mais par contre, pour un HP de - 50 mV, les tracés B_1 de la figure 14 montrent que le courant de queue ne s'annule que pour une valeur de - 30 mV. Les tracés B_2 montrent qu'au courant I_H bien activé ($E_i = + 40$ mV), correspond un courant de queue variant exponentiellement en fonction du temps dont le signe est positif, négatif ou nul suivant la valeur du potentiel de HP ; c'est là encore pour une valeur de HP de - 30 mV que le gradient électrochimique est nul puisqu'à cette valeur de potentiel, le courant de queue est inexistant. Par contre comme l'illustrent les tracés C de la figure 14, à - 30 mV le courant de queue est sortant puisque le pH externe est de 7,9 ; il s'annule à cette valeur de pH pour un potentiel de - 50 mV.

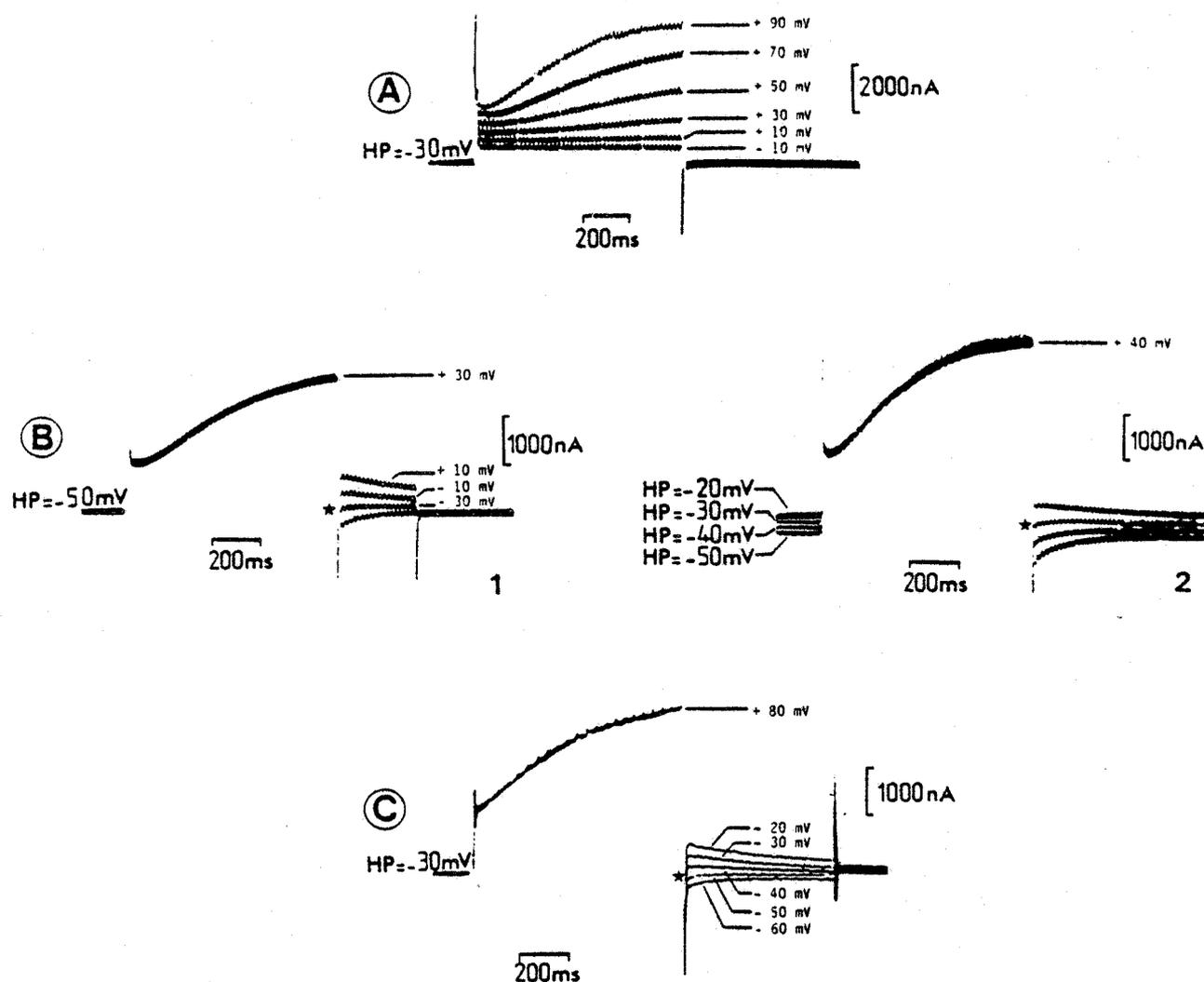


Figure 14

Détermination à l'aide de trois méthodes du potentiel d'inversion de I_H en milieu isotonique d'acétate de Ca pour deux valeurs de pH externe. A pH = 7,4 (A) le courant de queue est nul avec un HP de - 30 mV. A pH = 7,4 (B) le courant est nul pour un potentiel test de - 30 mV (double impulsion) (1) et pour un HP de - 30 mV (2). A pH = 7,9. $E_{rev} = - 50$ mV (C).



b - Analyse quantitative de g_H

Détermination du nombre de particules impliquées

lors de l'ouverture du canal I_H

En accord avec l'analyse précédente de g_K , l'équation donnant l'évolution de g_H en fonction du temps, pour un potentiel imposé déterminé, est la suivante :

$$g_H = \bar{g}_H \left[n_0 + (n_\infty - n_0) (1 - e^{-t/\tau}) \right]^x$$

Au potentiel HP de - 90 mV, la variable d'activation n_0 est égale à 0 puisque le seuil de potentiel d'activation de cette conductance est de l'ordre de 0 mV. Dans ces conditions, l'équation ci-dessus peut être simplifiée et devient :

$$g_H = \bar{g}_H \left[n_\infty (1 - e^{-t/\tau}) \right]^x$$

Comme $I_H = g_H (E_i - E_H)$, l'équation de I_H en fonction du temps devient pour un potentiel déterminé :

$$I_H = I_{H_\infty} (1 - e^{-t/\tau})^x$$

De l'équation précédente, il vient l'égalité suivante :

$$\text{Log} \left[1 - (I_H / I_{H_\infty})^{1/x} \right] = - t/\tau$$

Pour les différents tracés de courant I_H analysés, la meilleure corrélation, entre les deux variables $\text{Log} \left[1 - (I_H / I_{H_\infty})^{1/x} \right]$ et t , est très proche de 1 en prenant pour x la valeur 1. De plus dans ces conditions, l'ordonnée à l'origine de la droite de régression est dans tous les cas très proche de 0. Ceci suggère donc, tout à fait en accord avec les travaux de Barish et Baud (1984), obtenus sur l'ovocyte immature d'*Ambystoma*, que l'ouverture des canaux protons ne requiert lors de la dépolarisation activante que le déplacement d'une particule. Ces résultats sont obtenus en milieu de Ringer-TEA sans Na et donc dans ces conditions le courant dynamique activé lors des dépolarisations ne doit correspondre qu'à l'activation de la conductance g_H . L'étude relative à la désactivation du courant I_H confirme bien qu'une seule conductance est activée.

Désactivation de I_H

Au courant I_H , après son activation quasiment complète ($E_i = + 50$ mV), correspond un courant de queue qui diminue effectivement selon une exponentielle en fonction du temps comme le montrent les courbes des figures 15 et 16. La figure 16 montre en effet que la relation liant le logarithme du courant de désactivation en fonction du temps est linéaire. Comme la désactivation de I_H en fonction du temps se fait selon une exponentielle, ceci confirme qu'en milieu Ringer-TEA sans Na, une seule conductance en apparence est activée lors des dépolarisations.

Enfin, comme le montre la figure 17, la relation liant la valeur instantanée du courant de désactivation en fonction de la valeur du potentiel

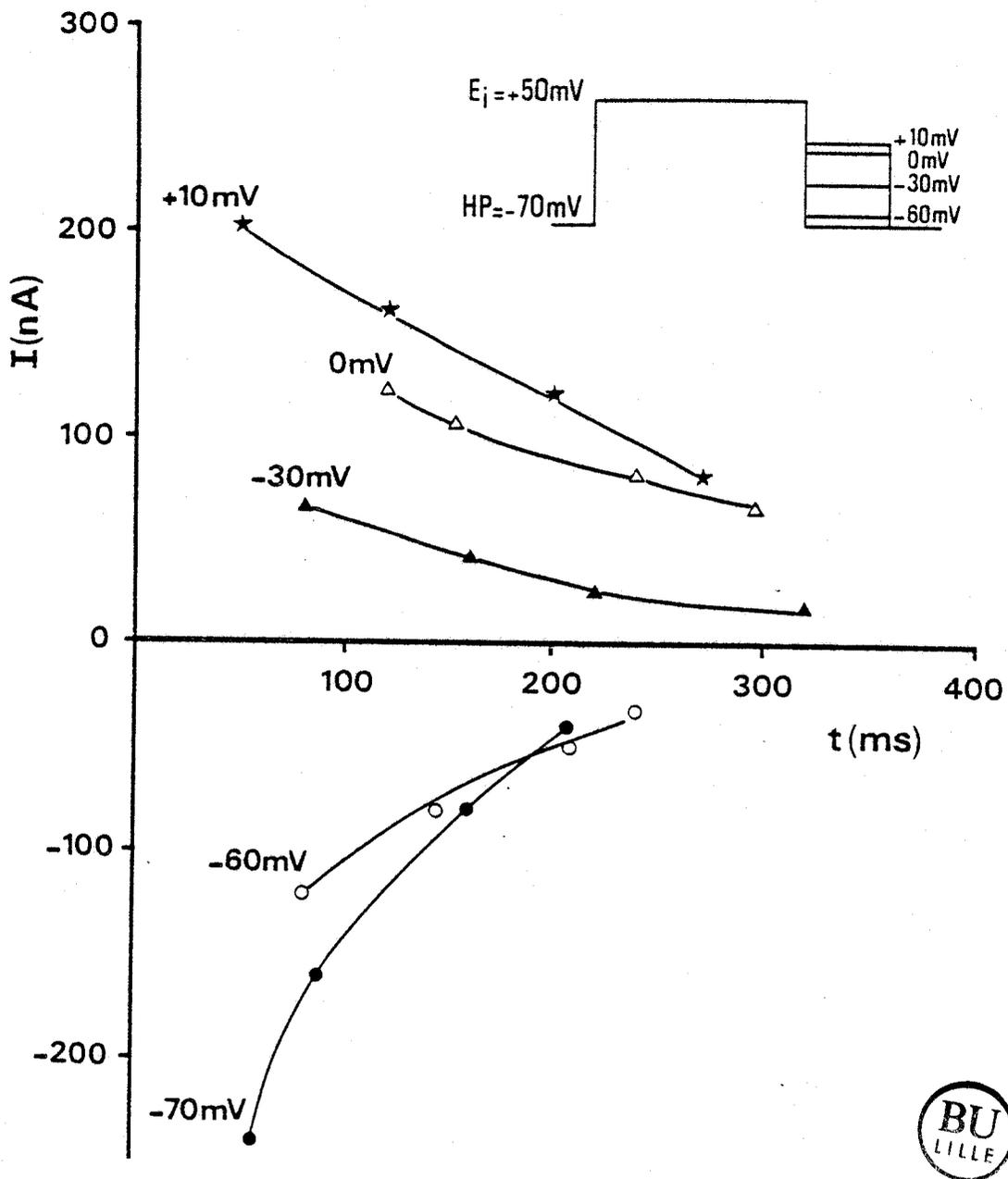


Figure 15

Déactivation de I_H en fonction du temps lors du retour à différents niveaux de potentiel. Les courants de queue sont obtenus suite à l'activation du courant sortant par une dépolarisation de 100 mV d'amplitude, pour différents potentiels test (-60 , -30 , 0 et $+10$ mV ; voir encart).

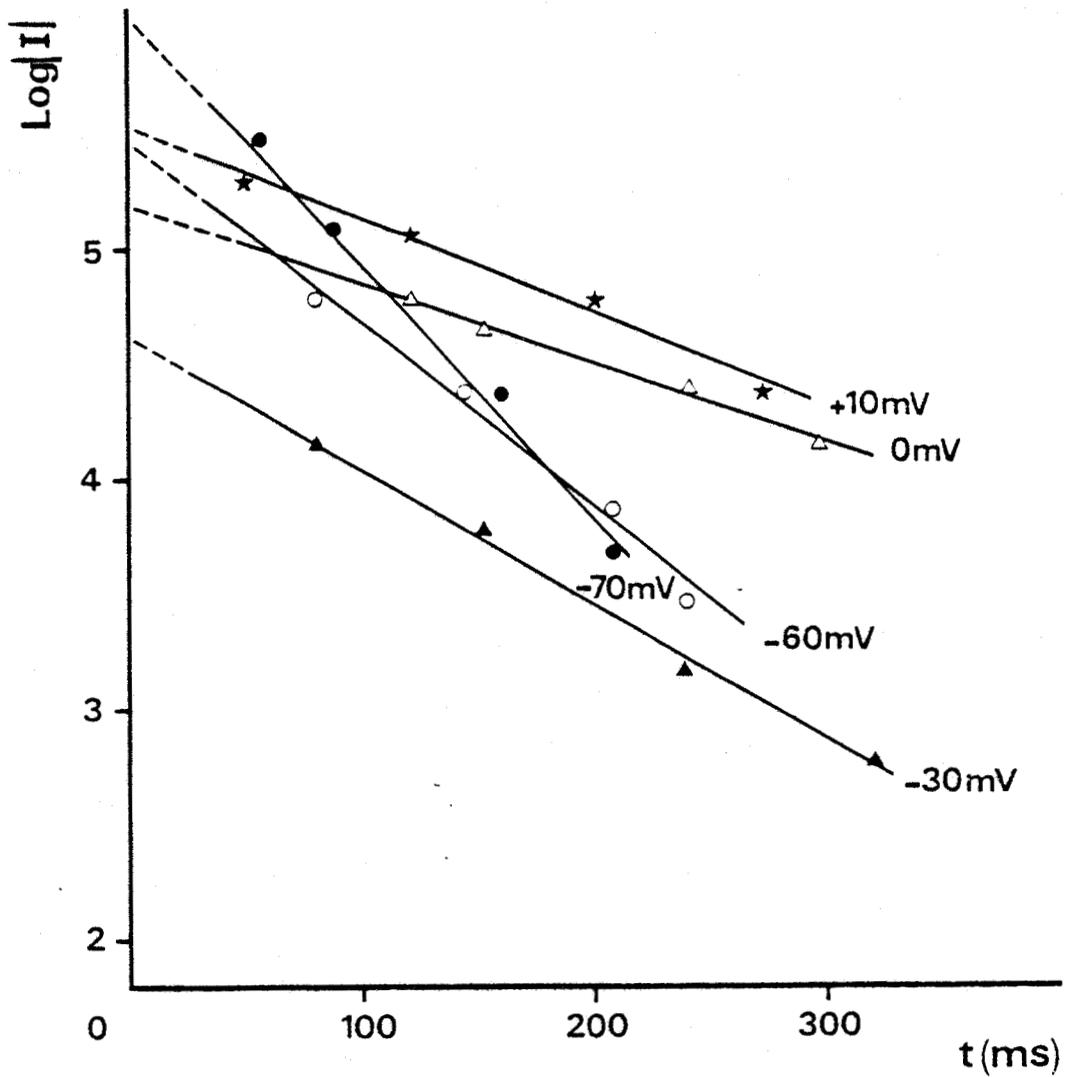


Figure 16

Relation linéaire liant le logarithme népérien du courant de désactivation au temps. Ces relations sont établies à partir des valeurs de courant de la figure précédente 15. Les courants instantanés sont obtenus par extrapolation de l'ordonnée à l'origine des différentes droites de régression.

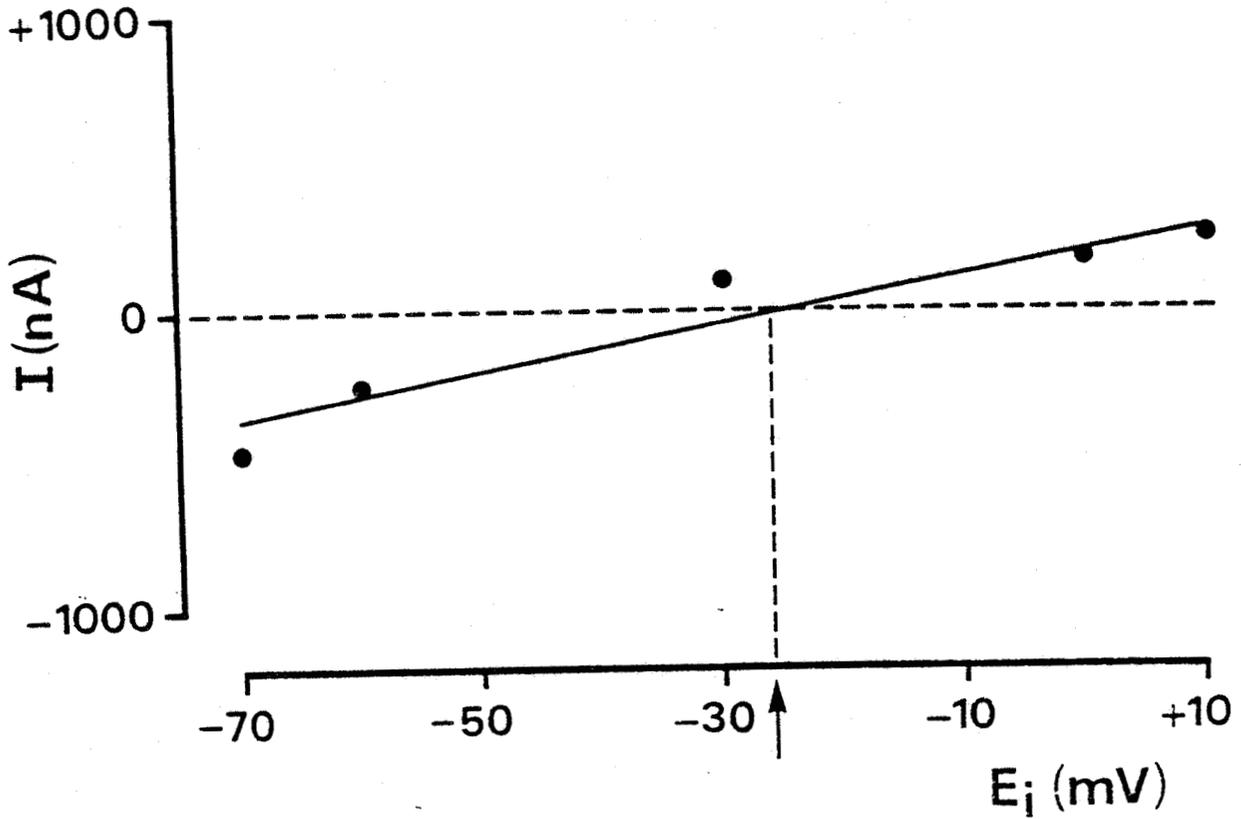


Figure 17

Courants instantanés extrapolés (voir fig. 16) en fonction du potentiel imposé E_i . Le potentiel d'inversion de I_H dans le cas présenté est d'environ -26 mV (indiqué par la flèche).

auquel est porté la membrane, est linéaire. A la valeur nulle du courant instantané de désactivation correspond un potentiel qui en théorie est égal au potentiel de la pile d'équilibre aux ions H^+ . Comme l'indique cette figure, la valeur de E_H pour cette expérience serait de - 26 mV.

*Détermination de la relation liant la variable
d'activation n_∞ au potentiel*

Puisqu'il a été déterminé précédemment qu'une seule particule activate est requise pour l'ouverture des canaux protons, cela implique que la variable d'activation à l'état stable, n_∞ , est égale au rapport g_{H_∞} / \bar{g}_H . Dans ces conditions, comme la relation qui lie n_∞ au potentiel E_i , est de la forme :

$$n_\infty = 1 / (1 + e^{(E/2 - E_i)/k}) ,$$

il s'ensuit l'équation suivante :

$$g_{H_\infty} = \bar{g}_H / (1 + e^{(E/2 - E_i)/k})$$

Les paramètres de cette équation sont définis comme suit : $E/2$ est le potentiel pour lequel la conductance g_{H_∞} est égale à $\bar{g}_H/2$, c'est-à-dire aussi pour $n_\infty = 0.5$; E_i est la valeur du potentiel imposé, k qui a les dimensions d'un potentiel est une constante de mise en forme de la relation sigmoïde. En prenant en compte les valeurs données par BARISH et BAUD (1984) en ce qui concerne l'ovocyte d'*Ambystoma*, il est ainsi possible sachant que $E/2 = 14$ mV

et $k = 14$ mV, de calculer la valeur de la conductance maximale \bar{g}_H puisque pour chaque valeur particulière de E_i , g_{H_∞} peut être calculée, elle est égale à $I_{H_\infty} / (E_i - E_H)$. Dans ces conditions, en supposant que pour l'ovocyte de *Rana esculenta* les valeurs des divers paramètres donnés ci-dessus par BARISH et BAUD pour un pH externe de 7,4 sont les mêmes, l'équation de $g_{H_\infty} = f(E_i)$ devient :

$$g_{H_\infty} = \bar{g}_H / (1 + e^{(14-E_i)/14})$$

Pour un pH de 6,8 les valeurs des divers paramètres de l'équation, données par ces derniers auteurs sont les suivants : $E/2 = 60$ mV et $k = 20$ mV.

Ainsi à pH 6,8, l'équation devient :

$$g_{H_\infty} = \bar{g}_H / (1 + e^{(60-E_i)/20})$$

Aussi à partir de ces deux valeurs de pH externe, il a été possible de calculer respectivement les valeurs de \bar{g}_H . Les courbes théoriques de la figure 18, tracées à partir des relations de BARISH et BAUD (1984) semblent correspondre à celles de *Rana esculenta*, puisque nos différents points calculés correspondant à g_{H_∞} / \bar{g}_H sont très proches de ces courbes. Comme le montre la figure, la diminution du pH externe déplace la courbe de $n_\infty (g_{H_\infty} / \bar{g}_H)$ en fonction du potentiel dans le sens des dépolarisations. De plus, la particule chargée qui conditionne lors de son déplacement, sous l'influence de la dépolarisation, l'ouverture des canaux protons, voit semble-t-il sa charge z diminuer avec la diminution du pH puisque pour un pH de 7,4 la charge est de 1,8 ($z = \frac{RT}{nF} / k$) alors qu'elle n'est que de 1,25 pour un pH de 6,8.

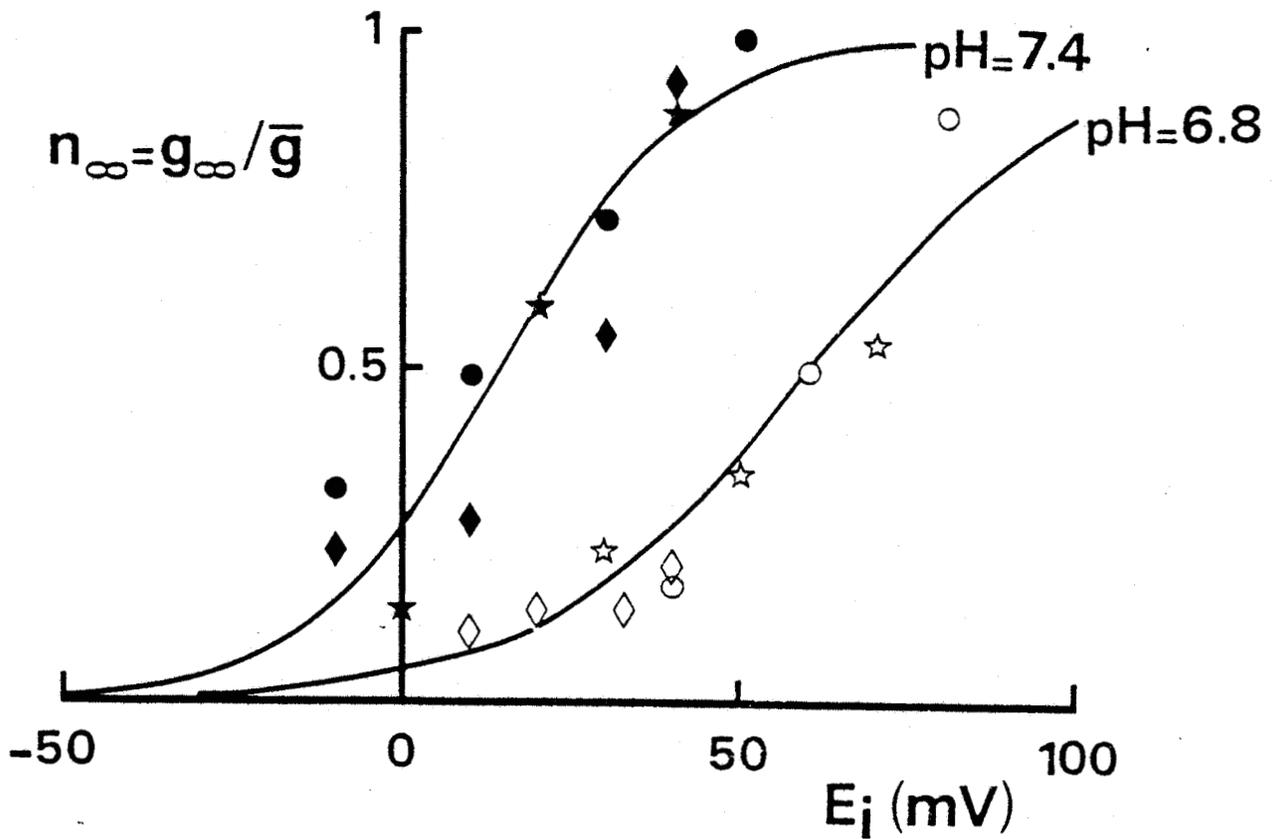


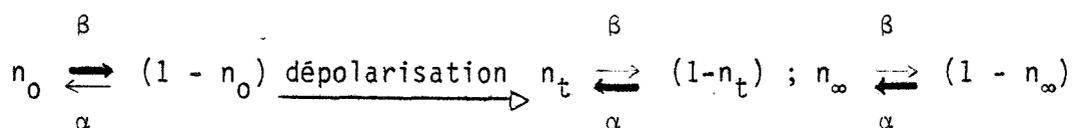
Figure 18

Variable d'activation ($n_{\infty} = g_{\infty} / \bar{g}$) en fonction du potentiel imposé E_i , en milieu de Ringer-TEA de pH 7,4 (symboles pleins) et de pH 6,8 (symboles évidés). Les courbes correspondent à celles établies par BARISH et BAUD (1984) sur l'ovocyte d'*Ambystoma*.

$n_{\infty} = g_{\infty} / \bar{g}$ puisque pour n_{∞}^x , x est égal à 1 (voir texte).

Constantes de vitesse α et β dépendant du potentiel

Comme cela est mentionné ci-dessus, le courant I_H s'active selon une relation de la forme $I_{H_\infty} (1 - e^{-t/\tau})^\alpha = I$ et se désactive exponentiellement en fonction du temps. Cela suggère que le courant sortant passe à travers un seul type de canaux sélectifs aux protons. Sous l'influence d'une dépolarisation à partir de valeurs de HP ≤ -30 mV, ces canaux subissent une transition et s'ouvrent pour laisser s'écouler le courant I_H . La transition de l'état fermé à l'état ouvert correspond au schéma suivant :



α et β sont des constantes de vitesse qui ne dépendent que du potentiel. Ainsi, sous l'influence d'une dépolarisation, à partir d'une valeur de HP ≤ -30 mV, le pourcentage de canaux ouverts (n_0) égal à 0 % (tous les canaux sont fermés) augmente progressivement au cours du temps (n_t) pour finalement atteindre une valeur stationnaire n_∞ , correspondant statistiquement au pourcentage de canaux ouverts ; le nombre de canaux dans la membrane étant arbitrairement fixé à 1 (ou 100 %). Les constantes α et β peuvent être déterminées pour chaque niveau de potentiel à partir des deux équations suivantes :

$$\tau = 1/(\alpha + \beta) \quad \text{et} \quad n_\infty = \alpha/(\alpha + \beta)$$

τ est la constante de temps d'activation et n_∞ la variable stationnaire d'activation qui correspond au pourcentage de canaux ouverts dans la membrane

interrogée pour une valeur particulière de E_j . Des deux équations précédentes, on tire :

$$\alpha = n_{\infty} / \tau \quad \text{et} \quad \beta = (1/\tau) - \alpha$$

Les relations liant α et β au potentiel pour un ovocyte, sont illustrées à la figure 19 pour un pH externe de 7,4. Il est à remarquer que les constantes de vitesse sont égales pour un potentiel E_j de l'ordre de 10 mV. Cette valeur de potentiel correspondant à la valeur 0,5 pour n_{∞} puisque $n_{\infty} = \alpha / (\alpha + \beta)$ est voisine de celle donnée par BARISH et BAUD (1984) en ce qui concerne l'ovocyte d'*Ambystoma*. Enfin, à partir des valeurs moyennes de τ et de n_{∞} , il a de même été possible de tracer les courbes correspondant aux deux relations liant les constantes moyennes de vitesse α et β au potentiel. Ces relations illustrées à la figure 20 montrent en accord avec BARISH et BAUD (1984) que α est bien égale à β pour une valeur de potentiel de 14 mV, potentiel pour lequel l'activation de la conductance aux protons atteint 50 % de sa valeur maximale au pH de 7,4.

C/ Effet du changement du pH externe sur le courant I_H ,
sa cinétique et la conductance aux ions H^+

1/ Effet sur le courant I_H

La figure 21 illustre les relations courant I_H -potentiel en milieu de Ringer TEA pour différentes valeurs de pH (7,4 ; 6,8 ; 6,4). L'effet majeur de la réduction du pH externe sur le courant est de déplacer la

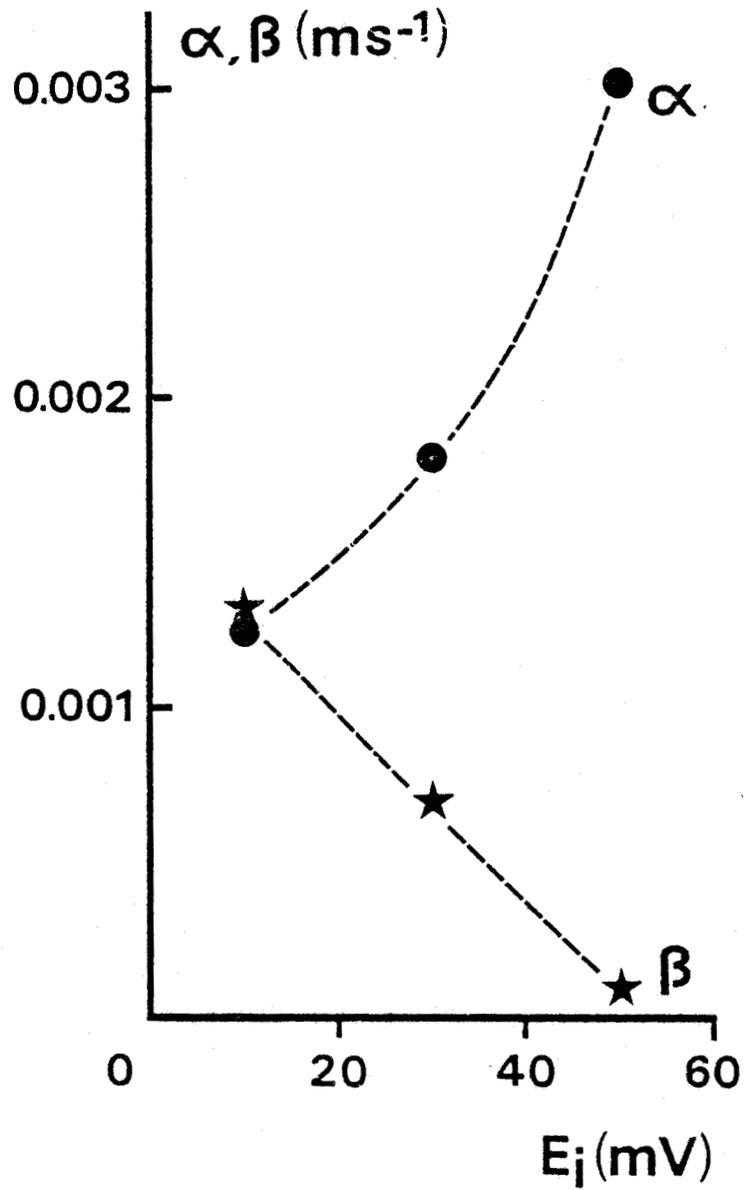


Figure 19

Constantes de vitesse α et β en fonction du potentiel, pour un ovocyte placé en milieu de Ringer-TEA de pH 7,4.

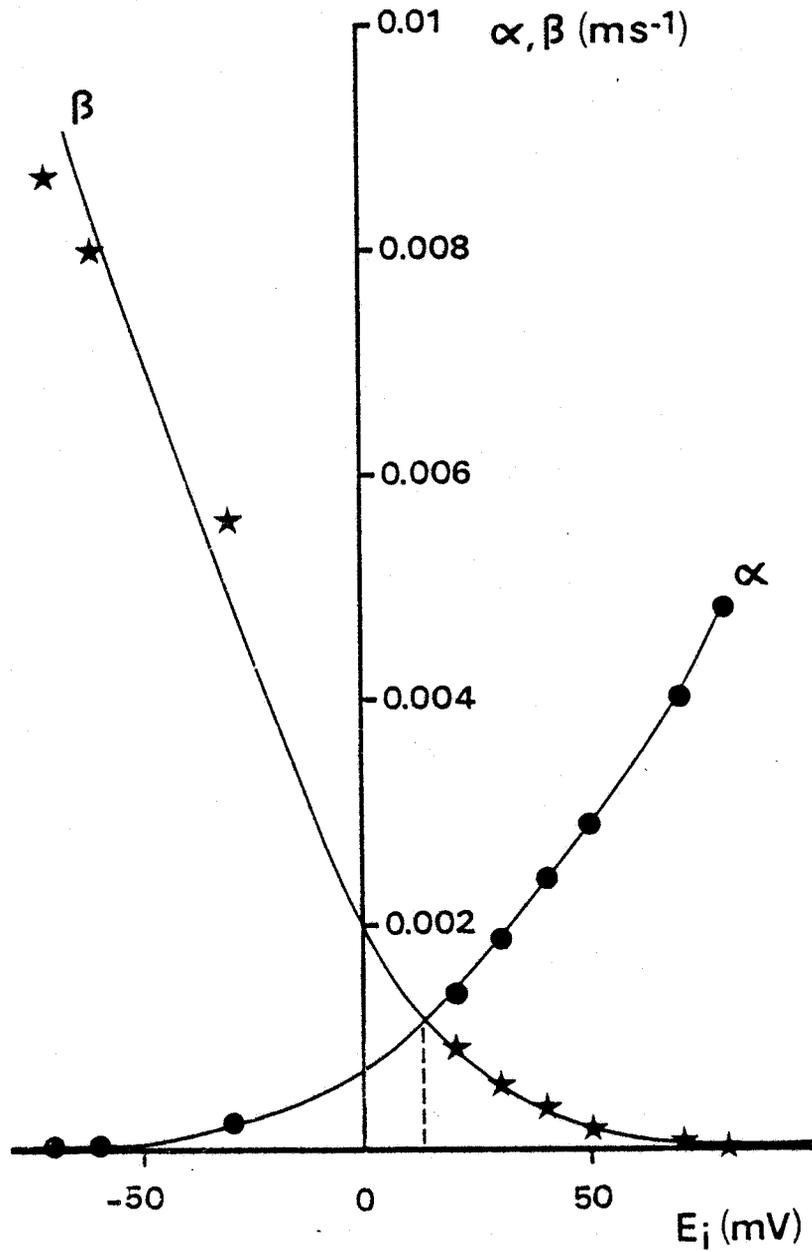


Figure 20

Constantes moyennes de vitesse (α et β) en fonction du potentiel, déterminées à partir des valeurs moyennes de n_{∞} (fig. 16) et celles de τ (fig. 22) en milieu de Ringer-TEA à pH 7,4. α et β sont égales pour un potentiel E_i de 14 mV.

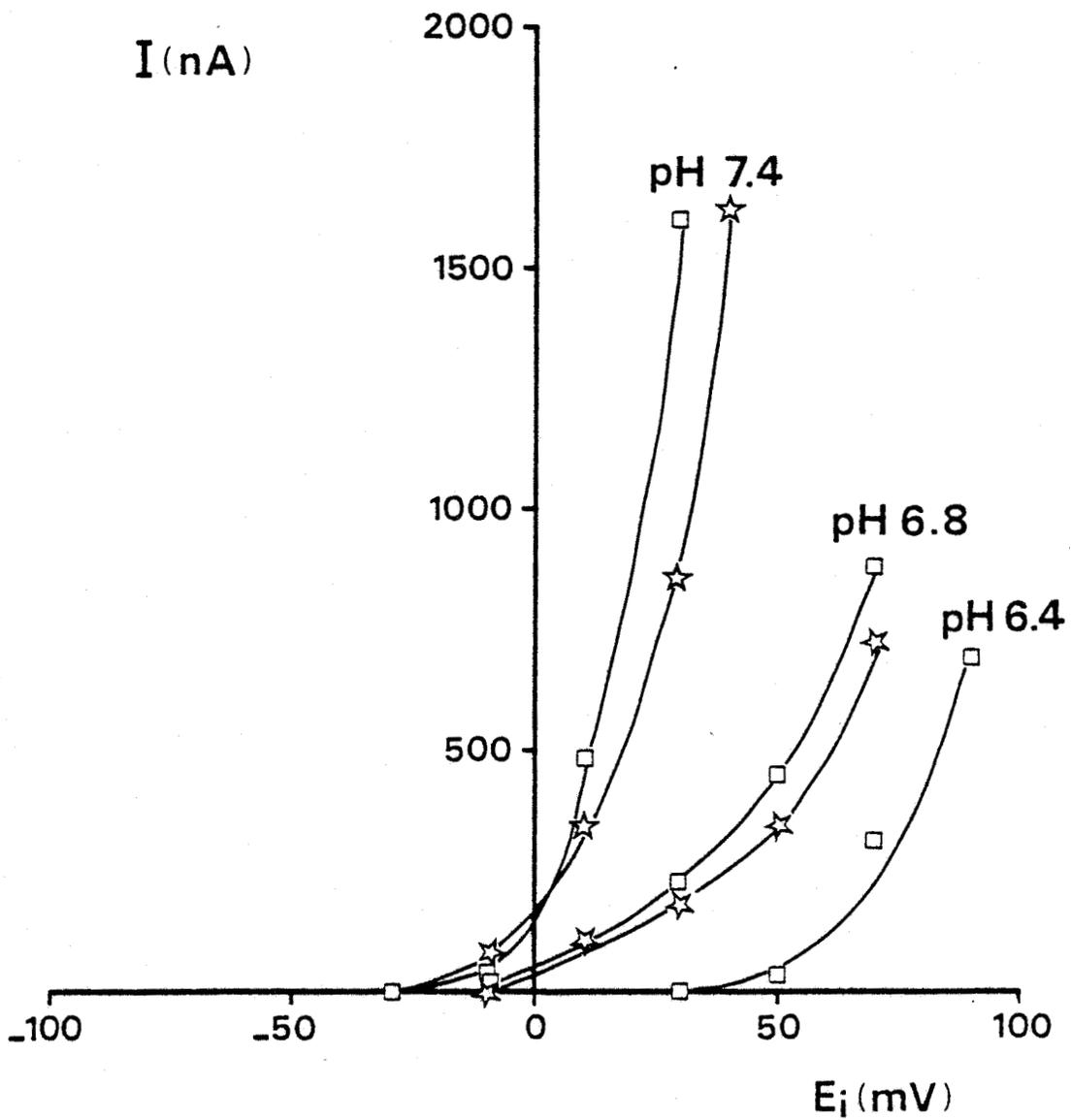


Figure 21

Effet du pH extracellulaire sur la relation courant potentiel établie en fin d'impulsion (1 s) après soustraction du courant de fuite, en milieu de Ringer-TEA pour trois valeurs de pH (7,4 ; 6,8 et 6,4).

courbe courant-potentiel correspondante dans le sens des dépolarisations. Ce déplacement n'est pas uniquement dû au changement du potentiel d'inversion de I_H mais également dû à un déplacement du seuil d'activation de la conductance aux protons dans le sens des dépolarisations. En effet, si la variation du potentiel d'inversion était la seule cause de ce déplacement, il serait enregistré un courant entrant porté par les ions H^+ dans la gamme des potentiels comprise entre le potentiel d'activation de la conductance aux protons (à pH 7,4) et le nouveau potentiel d'inversion de I_H au pH testé. Or il n'en est rien, aucun courant entrant n'est enregistré dans cette gamme de potentiel.

Enfin, la conductance maximale aux ions H^+ (\bar{g}_H) dépend également du pH externe. En plus du déplacement de la courbe traduisant la variable d'activation n_∞ (g_{H_∞}/g_H) en fonction du potentiel dans le sens des dépolarisations lors d'un abaissement du pH externe (fig. 18), il apparaît également qu'une diminution de \bar{g}_H soit associée à l'augmentation de la concentration extracellulaire des protons et donc à la diminution du pH. En effet, à partir des relations courant I_H - potentiel qui ont été établies pour les valeurs de pH de 7,4 et 6,8 (fig. 21) et des deux relations qui traduisent n_∞ en fonction du potentiel pour ces mêmes valeurs de pH (fig. 18), il est possible de calculer la valeur moyenne de \bar{g}_H à pH 7,4 et 6,8 ; les valeurs respectives sont $3 \cdot 10^{-5}$ S et $2 \cdot 10^{-5}$ S pour les différents ovocytes testés présentant tous le même diamètre et par conséquent, selon toute vraisemblance, la même surface de membrane interrogée ainsi que le même stade de développement. Cette vraisemblable diminution de conductance produite par l'augmentation de la concentration des ions H^+ n'est pas en accord avec les résultats de BARISH et BAUD (1984) qui observent à l'inverse sur l'ovocyte d'*Ambystoma* une augmentation de conductance avec la diminution du pH extracellulaire mais est par contre en accord avec ceux de BYERLY et al. (1984) concernant le neurone d'escargot.

2/ Effet du pH sur les constantes de temps d'activation et de déactivation

Les constantes de temps d'activation τ_1 et de déactivation τ_2 dépendant du potentiel peuvent être calculées respectivement à partir des deux relations suivantes :

$$I_H = I_{H_\infty} (1 - e^{-t/\tau_1}) \text{ et } I_H = I_{inst} e^{-t/\tau_2}$$

τ_1 et τ_2 peuvent ainsi être calculées ou déterminées graphiquement à partir des tracés de courant membranaire obtenus pour les différents niveaux testés de potentiel. τ_1 est égal au temps requis pour que le courant correspondant à l'activation ait atteint les 2/3 de sa valeur maximale, τ_2 est égal au temps requis pour que le courant de déactivation ait chuté des 2/3 de sa valeur initiale. Les courbes de la figure 22 illustrent les relations traduisant la variation de la constante τ_1 (symboles pleins) et τ_2 (symboles évidés) pour trois valeurs de pH (7,9 ; 7,4 et 6,8). Ces diverses courbes montrent que la constante de temps de déactivation est d'autant plus faible que la membrane est portée à des potentiels plus négatifs, par contre la constante de temps d'activation (symboles évidés) est d'autant plus faible que le potentiel est positif. De plus l'effet du pH externe sur ces constantes est, comme le montre la figure, d'augmenter τ_2 quand le pH externe augmente alors qu'à l'inverse τ_1 diminue. La diminution du pH externe traduit donc un déplacement de ces constantes de temps vers les dépolarisations ce qui est tout à fait en accord avec le déplacement dans le même sens de la relation sigmoïde liant n_∞ au potentiel.

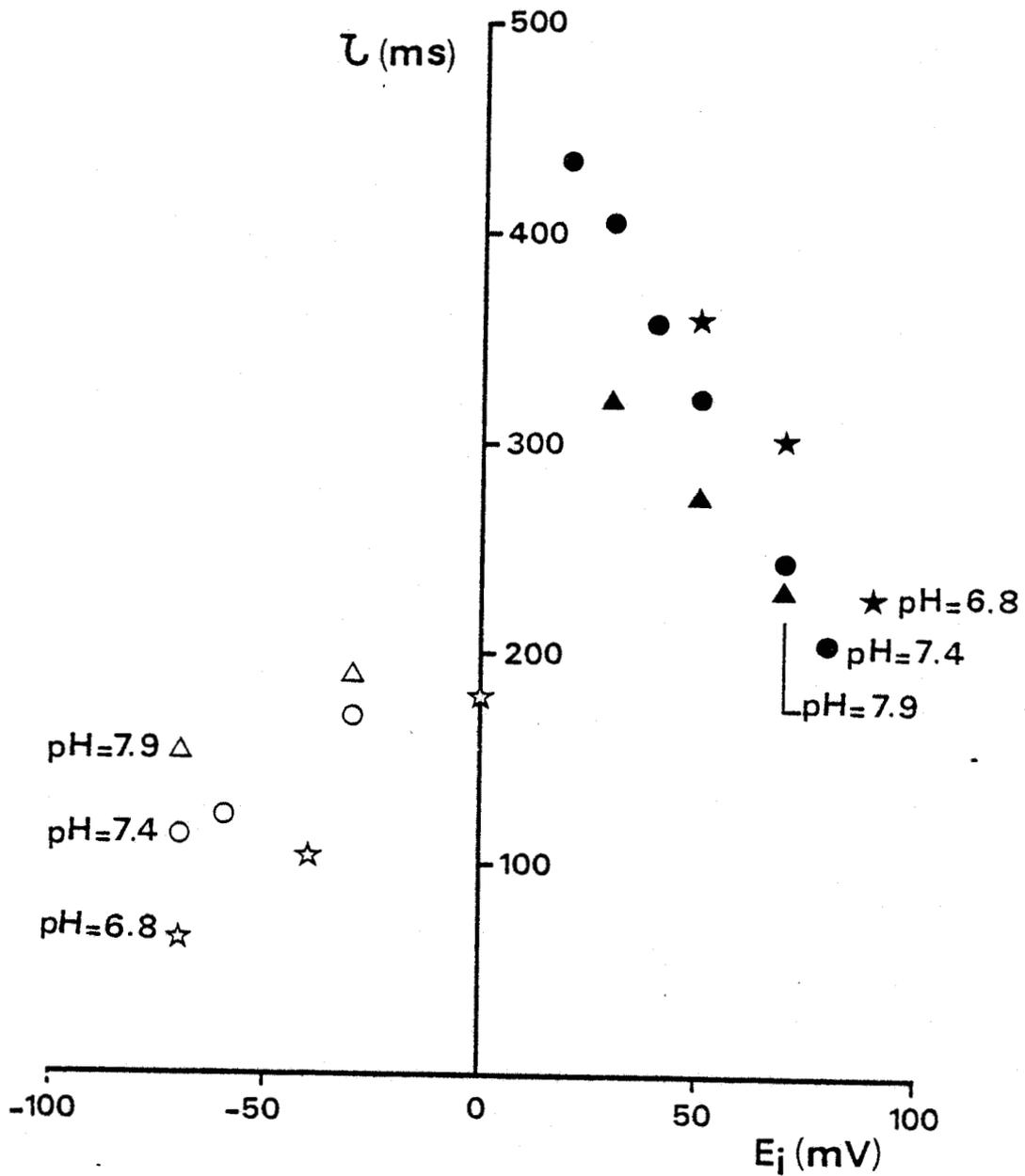


Figure 22

Constantes de temps d'activation (symboles pleins) et de désactivation (symboles évidés) en fonction du potentiel, en milieu de Ringer-TEA pour trois valeurs de pH extracellulaire : 7,9 (Δ , \blacktriangle) ; 7,4 (\circ , \bullet) et 6,8 (\star , \star).

D/ Effet du Cd sur le courant I_H

Il est connu que le courant sortant résiduel au niveau des neurones de *Lymnae* est un courant porté par les ions H^+ (BYERLY et al., 1984). Ce courant est fortement réduit par les agents bloquant les canaux calciques (BYERLY et HAGIWARA, 1982). Le Cd, inhibiteur du canal calcique, bloque également le courant I_H au niveau des neurones d'*Helix* (THOMAS et MEECH, 1982). Sur les neurones de *Lymnae*, BYERLY et al. (1984) montrent aussi que le Cd a trois effets essentiels sur la conductance g_H , à savoir : i) une réduction du taux d'activation des canaux aux ions H^+ ; ii) une réduction de la conductance maximale ; iii) un déplacement de la courbe d'activation de la conductance dans le sens des dépolarisations. Sur les ovocytes d'*Ambystoma*, BARISH et BAUD (1984) démontrent que le Cd a exactement les mêmes effets que ceux mentionnés ci-dessus. En particulier, ils observent que la conductance et les constantes de temps décroissent avec l'augmentation de la concentration externe en Cd.

Le Cd est également signalé dans la littérature pour ses effets bloquants sur les courants entrants calciques (voir revue de HAGIWARA et BYERLY, 1981) et les courants sortants passant cependant à travers les canaux "calciques" (LEE et TSIEN, 1983). De plus, comme il est démontré par de nombreux auteurs que le Ca n'a pas d'effet sur le courant I_H , l'effet du Cd apparaît donc en définitive s'exercer directement sur les canaux protons.

Le courant I_H de l'ovocyte de *Rana esculenta*, comme cela est illustré à la figure 23 est également réduit par le Cd. En effet, à la

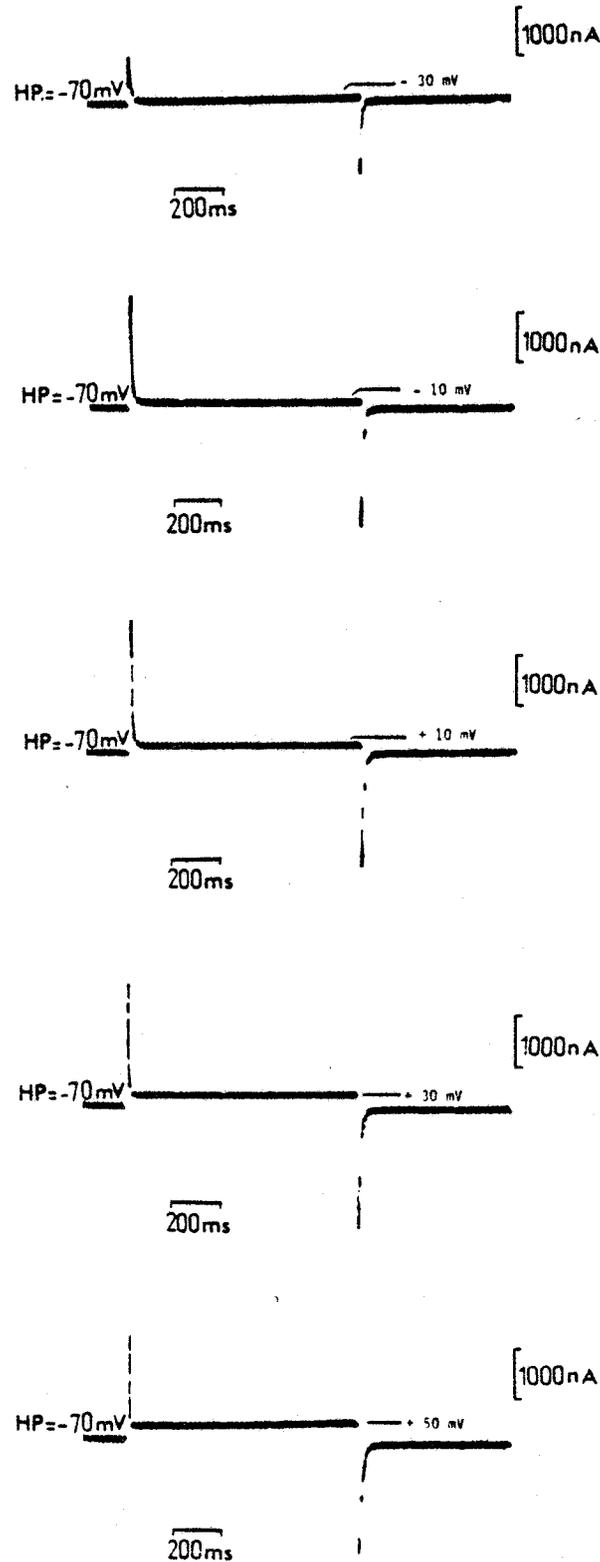


Figure 23

Courant membranaire sortant obtenu pour différentes dépolarisations en milieu de Ringer-Cs-Cd de pH 7,4.

concentration 300 μM en Ringer-Cs, l'amplitude du courant I_H diminue considérablement comme le montrent les courbes courant-potentiel de la figure 24 obtenues dans les conditions de référence et en présence de Cd associé au Cs.

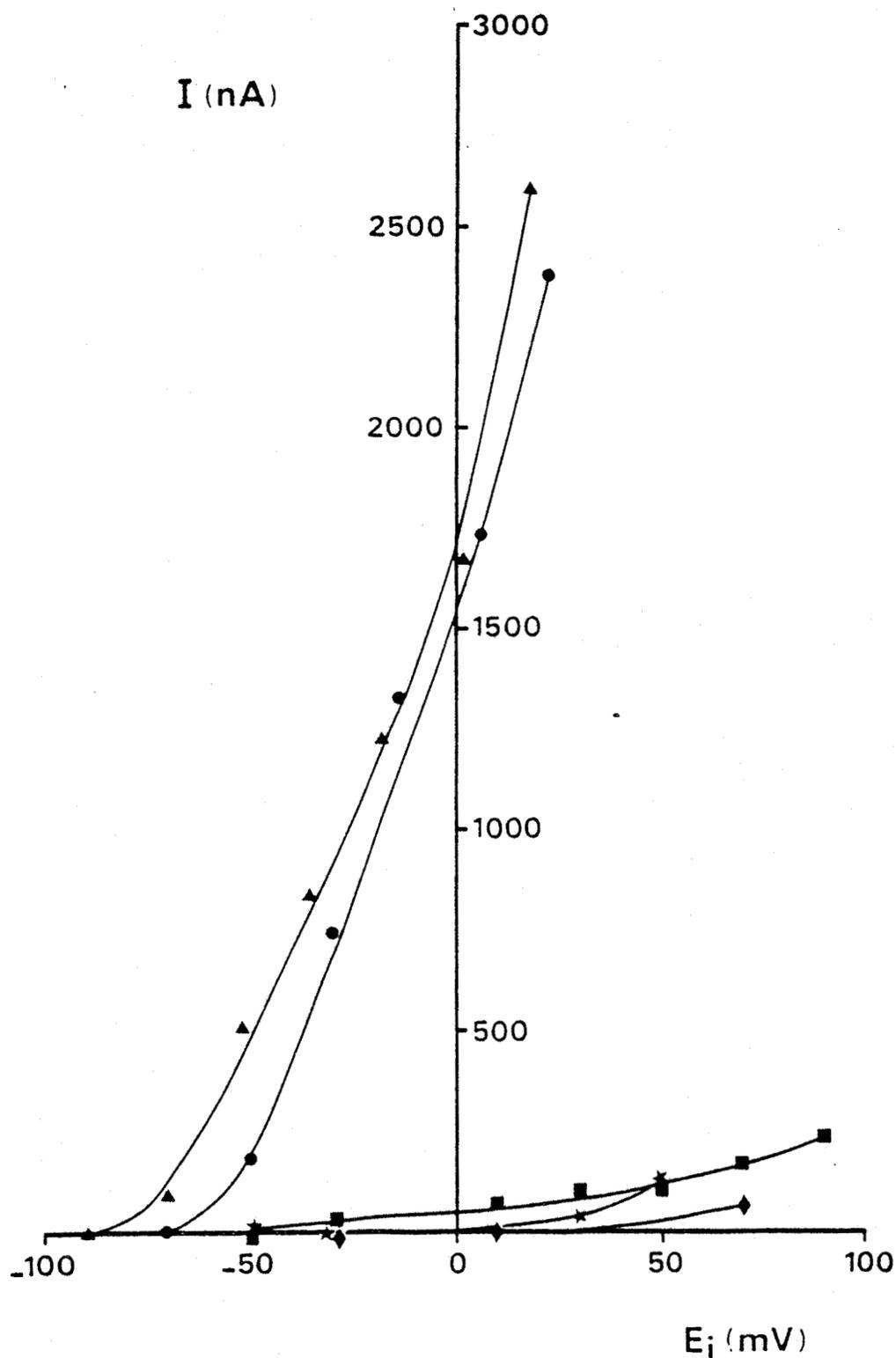


Figure 24

Relations courant-potential établies en fin d'impulsion (1 s) en Ringer normal (▲, ●) et en Ringer-Cs-Cd (■, ★, ◆).

RESUME ET CONCLUSION

Les courants membranaires de l'ovocyte immature de *Rana esculenta* sont étudiés à l'aide de la technique des deux microélectrodes. Aucun courant entrant suite à des dépolarisations n'est détecté à ce stade de développement (le diamètre des ovocytes étant de 1 mm). Lors d'hyperpolarisations, une rectification dans le sens entrant apparaît, rectification qui semble être comme chez l'oeuf d'étoile de mer, de nature potassique, dans la mesure où cette rectification disparaît en présence de TEA ou de Cs.

Lors de dépolarisations, un courant sortant dépendant du temps et du potentiel est mis en évidence sur ces ovocytes. Ce courant dynamique sortant est un courant résultant de l'activation de deux composantes, différenciées par leur niveau d'activation et leur potentiel d'inversion : une composante I_K portée par les ions K^+ et une composante portée par les protons I_H . Le courant I_K a son potentiel seuil d'activation vers - 50 mV et son potentiel d'inversion vers - 110 mV.

La disparition du courant I_K en présence de TEA permet d'étudier le courant I_H . Ce dernier courant qui constitue la majeure partie du courant sortant chez l'ovocyte de *Rana esculenta*, s'active au pH normal 7,4 à un potentiel seuil de l'ordre de 0 mV, présente un potentiel d'inversion de - 30 mV. La variation de la concentration externe aux ions K^+ ou aux ions Cl^- est sans effet sur le potentiel d'inversion du courant I_H alors qu'une variation externe d'une unité pH provoque un changement de 56 mV, ce qui suggère que les canaux à travers lesquels s'écoulent les ions H^+ sont très spécifiques.

La relation liant la conductance g_H au potentiel est sigmoïde ; le potentiel correspondant à la demi-activation étant de l'ordre de 14 mV à pH 7,4. Les constantes de temps d'activation et de désactivation sont proportionnelles à $1-e^{-t/\tau}$. Les constantes de vitesse α et β sont égales pour un potentiel de 14 mV, potentiel pour lequel le taux d'activation de la conductance aux protons est de 50 p. 100.

En plus de la dépendance au potentiel, l'activation du courant I_H est également dépendante du pH externe puisque les différents paramètres des équations permettant de déterminer l'évolution du courant I_H en fonction du temps et du potentiel varient avec le pH. En effet, lors d'un abaissement du pH externe les variations sont les suivantes :

- diminution de l'amplitude du courant I_H par suite du déplacement de la courbe courant-potentiel vers les dépolarisations ; déplacement traduisant en plus de l'augmentation de la valeur du potentiel d'inversion, le changement du potentiel seuil d'activation dans le sens des dépolarisations ;

- diminution de la conductance maximale aux protons ;

- déplacement de la variable d'activation n_∞ dans le sens des dépolarisations avec une augmentation du paramètre k de la relation sigmoïde ($n_\infty = f(E_i)$), augmentation qui entraîne d'après le calcul une variation de la charge de la particule activante dont le déplacement conditionne l'ouverture du canal aux protons ;

- à un potentiel donné, augmentation de la vitesse d'activation et diminution de celle de désactivation dues à un déplacement des constantes de temps correspondantes dans le sens des dépolarisations.

La dépendance de l'activation de I_H au pH pourrait s'expliquer en supposant l'existence d'un mécanisme impliquant une liaison des ions H^+ avec quelques composantes de la surface membranaire conduisant à la diminution du potentiel de surface ; cette diminution serait capable d'affecter aussi les mécanismes d'ouverture et de perméabilité des canaux ioniques comme l'ont suggéré OHMORI et YOSHII en 1977.

Enfin, en accord avec les résultats de plusieurs auteurs, le courant I_H chez *Rana esculenta* est fortement réduit par le Cd. Comme il a été démontré que le courant I_H est indépendant du Ca, l'effet du Cd paraît donc s'exercer directement sur les canaux aux protons.

. BIBLIOGRAPHIE

ADRIAN, R.H. (1964)

The rubidium and potassium permeability of frog muscle membrane.
J. Physiol., London, 175, 134-159.

AHMED, Z. et CONNOR, J. (1980)

Intracellular pH changes induced by calcium influx during electrical activity in molluscan neurones. J. gen. Physiol., 75, 403-426.

BARISH, M.E. (1983)

A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. J. Physiol., London, 342, 309-325.

BARISH, M.E. (1984)

Calcium-sensitive action potential of long duration in the fertilized egg of the ctenophore *Mnemiopsis meiyi*. Devel. Biol., 105, 29-40.

BARISH, M.E. et BAUD, C. (1984)

A voltage gated hydrogen ion current in the oocyte membrane of the axolotl, *Ambystoma*. J. Physiol., London, 352, 243-263.

BAUD, C. (1983)

Development change of a depolarization-induced sodium permeability in the oocyte of the *Xenopus laevis* oocyte. Devel. Biol., 99, 524-528.

BAUD, C. et KADO, R.T. (1984)

Induction and disappearance of excitability in the oocyte of *Xenopus laevis* : a voltage-clamp study. J. Physiol. London, 356, 257-289.

BAUD, C., KADO, R.T. et MARCHER, K.S. (1982)

Sodium channels induced by depolarization of the *Xenopus laevis* oocyte. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 79, 3188-3192.

BEZANILLA, F. et ARMSTRONG, C.M. (1972)

Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into potassium channels in squid axons. J. gen. Physiol., 60, 588-608.

BROWN, H.M. et MEECH, R.W. (1979)

Light induced changes of internal pH in a barnacle photoreceptor and the effect of internal pH on the receptor potential. *J. Physiol.*, London, 297, 73-93.

BROWN, H.M., MEECH, R.W. et THOMAS, R.C. (1976)

pH changes induced by light in large *Balanus* photoreceptors. *Biophys. J.*, 16, 33 a.

BYERLY, L. et HAGIWARA, S. (1982)

Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Limnaea stagnalis*. *J. Physiol.*, London, 322, 503-528.

BYERLY, L. et MOODY, W.J. (1986)

Membrane currents of internally perfused neurones of the snail, *Limnaea stagnalis*, at low intracellular pH. *J. Physiol.*, London, 376, 477-491.

BYERLY, L., MEECH, R. et MOODY, W. Jr. (1984)

Rapidly activating hydrogen ion currents in perfused neurones of the snail, *Limnaea stagnalis*. *J. Physiol.*, London, 351, 199-216.

DICK, D.A.T. et Mc LAUGHLIN, S.G.A. (1969)

The activities and concentration of sodium and potassium in toad oocytes. *J. Physiol.*, London, 205, 61-78.

ECKERT, R. et CHAD, J.E. (1984)

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

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

Two calcium currents in *Neanthes arenaceodentatus* egg cell membranes. *J. Physiol.*, London, 356, 491-505.

GAY, L.A. et STANFIELD, P.R. (1977)

Cs⁺ causes a voltage-dependent block of inward K currents in resting skeletal fibres. *Nature*, 267, 169-170.

- GRAINGER, J.L., WINKLER, M.M., SHEN, S.S. et STEINHARDT, R.A. (1979).
Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin
egg and early embryo. *Devel. Biol.* 68, 396-306.
- HAGIWARA, S. (1983)
Membrane potential-dependent ion channels in cell membrane. New-York :
Raven press.
- HAGIWARA, S. et BYERLY, L. (1981)
Calcium channels. *A. Rev. Neurosci.*, 4, 69-125.
- HAGIWARA, S. et JAFFE, L.A. (1979)
Electrical properties of egg cell membranes. *A. Rev. Biophys. Bioeng.*,
8, 385-416.
- HAGIWARA, S. et YOSHII, M. (1979)
Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification
of the strafish egg as examined by internal perfusion. *J. Physiol.*,
London, 292, 251-265.
- HAGIWARA, S., OZAWA, S. et SAND, O. (1975)
Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg
cell membrane of a strafish. *J. gen. Physiol.*, 65, 617-644.
- HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S. et ROSENTHAL, N.P. (1976)
Potassium current and the effect of cesium on this current during
anomalous rectification of the egg cell membrane of a strafish.
J. Physiol., London, 67, 621-638.
- HAGIWARA, S., MIYAZAKI, S., KRASNE, S. et CIANI, S. (1977)
Anomalous permeabilities of the egg cell membrane of a strafish in
 K^+ - Tl^+ mixtures. *J. gen. Physiol.*, 70, 269-281.
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. (1952)
A quantitative description of membrane current and its application
to conduction and excitation-contraction in nerve. *J. Physiol. London*,
117, 500-544.

HOULE, J.G. et WASSERMAN, W.J. (1983)

Intracellular pH plays a role in regulating protein synthesis in *Xenopus* oocytes. *Devel. Biol.*, 97, 302-312.

ISENBERG, G. (1976)

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

JAFFE, L.A. et GUERRIER, P. (1981)

Localization of electrical excitability in the early embryo of *Dentalium*. *Devel. Biol.*, 83, 370-373.

KADO, R.T., MARCHER, K.S. et OZON, R. (1979)

Mise en évidence d'une dépolarisation de longue durée dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 288 D, 1187-1189.

KADO, R.T., MARCHER, K. et OZON, R. (1981)

Electrical membrane properties of the *Xenopus laevis* oocyte during progesterone-induced meiotic maturation. *Devel. Biol.*, 84, 471-476.

KANNO, Y. et LOEWENSTEIN, W.R. (1963)

A study of the nucleus and cell membranes with an intracellular electrode. *Exp. Cell. Res.*, 31, 149-166.

KATZ, B. (1949)

Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch. Sci. Physiol.* 3, 285-300.

KATZ, B. et MILEDI, R. (1967)

A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol., London*, 192, 407-436.

KATZ, B. et MILEDI, R. (1969)

Tetrodotoxin-resistant electric activity in presynaptic terminals. *J. Physiol., London*, 203, 459-487.

- KATZ, B. et MILEDI, R. (1971)
The effect of prolonged depolarization on synaptic transfer in the stellate ganglion of the squid. *J. Physiol.*, London, 216, 503-512.
- KEYNES, R.D., ROJAS, E., TAYLOR, R.E. et VERGARA, J. (1973)
Calcium and potassium systems of a giant barnacle muscle fibre under membrane potential control. *J. Physiol.*, London, 229, 409-455.
- KOSTYUK, P.G., KRISHTAL, O.A. et SHAKHOVALOV, Y.A. (1977)
Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. *J. Physiol.*, London, 270, 545-568.
- KUSANO, K., MILEDI, R. et STINNAKRE, J. (1977).
Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature*, London, 270, 739-741.
- KUSANO, K., MILEDI, R. et STINNAKRE, J. (1982)
Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol.*, London, 328, 143-170.
- LAMGHARI MOUBARRAD, F.Z. (1985)
Mise en évidence d'une conductance aux ions H^+ dépendant du potentiel et du temps de la membrane d'ovocyte de grenouille. D.E.A. Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.
- LEE, K.S. et TSIEN, R.W. (1982)
Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. *Nature*, London, 297, 498-501.
- LEE, S.C. et STEINHARDT, R.A. (1981)
pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Devel. Biol.* 85, 358-369.
- LOTAN, I., DASCAL, N., COHEN, S. et LASS, Y. (1982)
Adenosine induced slow ionic currents in the *Xenopus* oocyte. *Nature*, London, 298, 572-574.

Mac DONALD, V.W. et JOBSIS, F.F. (1976)

Spectrophotometric studies on the pH of the frog skeletal muscle. pH changes during and after contractile activity. *J. gen. Physiol.*, 68, 179-195.

MAENO, T. (1959)

Electrical characteristics and activation potential of *Bufo* eggs. *J. gen. Physiol.*, 43, 139-157.

MILEDI, R. (1982)

A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 215, 491-497.

MIYAZAKI, S., TAKAHASHI, K. et TSUDA, K. (1972)

Calcium and sodium contributions to regenerative responses in the embryonic excitable cell membrane. *Science*, 176, 1441-1443.

MIYAZAKI, S., TAKAHASHI, K. et TSUDA, K. (1974)

Electrical excitability in the egg cell membrane of the tunicate. *J. Physiol., London*, 238, 37-54.

MIYAZAKI, S.I., OHMORI, H. et SASAKI, S. (1975)

Potassium rectifications of the starfish oocyte membrane and their changes during oocyte maturation. *J. Physiol., London*, 246, 55-78.

MORRILL, G.A. et WASTON, D.E. (1966)

Transmembrane potential changes in amphibian eggs at ovulation activation and first cleavage. *J. Cell. Physiol.*, 67, 85-92.

O'DONNELL, M.J. (1985)

Calcium action potentials in the developing oocytes of an insect, *Rhodnius prolixus*. *J. exp. Biol.*, 119, 287-300.

OHMORI, H. et YOSHII, M. (1977)

Surface potential reflected in both gating and permeation mechanisms of sodium and calcium channels of the tunicate egg cell membrane. *J. Physiol., London*, 267, 429-463.

- OKAMOTO, H., TAKAHASHI, K. et YOSHII, M. (1976)
Two components of the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate. *J. Physiol.*, London, 255, 527-561.
- PERES, A., BERNARDINI, G. (1983)
A hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *Pflügers Arch.*, 399, 157-159.
- PERES, A. et MANCINELLI, E. (1985)
Sodium conductance and the activation potential in *Xenopus laevis* eggs. *Pflügers Arch.*, 405, 29-36.
- ROBINSON, K.R. (1979)
Electrical currents through full-grown and maturing *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 837-841.
- ROOS, A. et BORON, W.F. (1981)
Intracellular pH. *Physiol. Rev.*, 61, 296-434.
- SCHLICHTER, L.C. (1983 a)
Spontaneous action potentials produced by Na and Cl channels in maturing *Rana pipiens* oocytes. *Devel. Biol.*, 98, 47-59.
- SCHLICHTER, L.C. (1983 b).
A role for action potentials in maturing *Rana pipiens* oocytes. *Devel. Biol.* 98, 60-69.
- SHIH, R.J., O'CONNOR, C.M., KEEM, K. et SMITH, L.D. (1978).
Kinetic analysis of amino acid pools and protein synthesis in amphibian oocytes and embryos. *Devel. Biol.*, 66, 172-182.
- SMITH, L.D. (1981)
Frog oocytes and sea urchin eggs : steroid hormones and sperm induce similar events. *Fortschr. Zool.*, 26, 35-47.

STANFIELD, P.R. (1970)

The effects of the tetraethylammonium ions on the delayed currents of frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, London, 209, 209-229.

STEINHARDT, R.A. et EPEL, D. (1974)

Activation of sea-urchin egg by a calcium ionophore. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1915-1919.

STEINHARDT, R.A., EPEL, D., CARROLL, E.J. Jr et YANAGIMACHI, R. (1974)

Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs ? *Nature*, London, 252, 41-43.

TAKAHASHI, K., MIYAZAKI, S., KIDAKORO, Y. (1971)

Development of excitability in embryonic muscle cell membrane in certain tunicates. *Science*, 171, 415.

THOMAS, R.C. (1977)

The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. *J. Physiol.*, London, 273, 317-338.

THOMAS, R.C. et MEECH, R.W. (1982)

Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature*, London, 299, 826-828.

TUPPER, J.T. et MALOFF, S.L. (1973)

The ionic permeability of the amphibian oocyte in the presence or absence of external calcium. *J. Exp. Zool.*, 185, 133-143.

VILAIN, J.P., CAPURON, A. et GUILBAULT, P. (1971)

Caractéristiques électriques membranaires des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* michah (Amphibien urodèle). *C.R. Soc. Biol.*, 165, 1594-1600.

VITTO, A.J.R. et WALLACE, R.A. (1976)

Maturation of *Xenopus* oocytes. I. Facilitation by ouabaïn. *Exp. Cell. Res.*, 97, 56-62.

WALLACE, R.A. et STEINHARDT, R.A. (1977).

Maturation of *Xenopus* oocytes. II. Observations on membrane potential. *Devel. Biol.*, 57, 305-316.

WHINKLER, M.M., STEINHARDT, R.A., GRAINGER, J.L. et MINNING, L. (1980)

Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature, London*, 287, 558-560.

WHITAKER, M.J. et STEINHARDT, R.A. (1982).

Ionic regulation of egg activation. *Q. Rev. Biophys.*, 15, 593-666.

ZIEGLER, D. et MORRILL, G.A. (1977)

Regulation of the amphibian oocyte plasma membrane ion permeability by cytoplasmic factors during the first meiotic division. *Dev. Biol.*, 60, 318-325.

