

50376
1995
89

20103366

Université des Sciences et Technologies de LILLE I

THESE

présentée pour obtenir

le grade de DOCTEUR EN SCIENCES de
l'Université de LILLE I

par

TOUSSAINT-SASSOU ETCHRIVI

EFFET DE L'HALOTHANE SUR LES PROPRIETES MECANQUES INTRINSEQUES DU MUSCLE SQUELETTIQUE : APPLICATION A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE.

Soutenue le 06 Avril 1995 devant la Commission d'Examen :

Président : **B. DUPUIS**, *Professeur, Université de Lille II*
Directeur de Thèse : **P. ADNET**, *Professeur, Université de Lille II*
Rapporteurs : **R. VENTURA-CLAPIER**, *Directeur de Recherche CNRS (Paris)*
D. CHEMLA, *Chargé de Recherche INSERM (Palaiseau)*
Examineurs : **G. BRULE**, *Professeur, Université d'Amiens*
G. HAUDECOEUR, *Professeur, Université de Lille I*
R.M. KRIVOSIC-HORBER, *Professeur, Université de Lille II*
C. LEOTY, *Professeur, Université de Nantes*

Travail réalisé au Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Lille.



à Monsieur le Professeur Bernard DUPUIS

Je vous remercie vivement de m'avoir accueilli dans votre Laboratoire de Pharmacologie et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je suis particulièrement heureux de vous exprimer ma profonde reconnaissance pour la confiance que vous m'avez témoignée ainsi que pour les précieux conseils que vous m'avez prodigués.

à Monsieur le Professeur Pascal ADNET

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Pascal ADNET.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde gratitude et mon admiration pour votre rigueur et votre passion pour la recherche scientifique, qui restent pour moi un exemple.

à Madame R. VENTURA-CLAPIER

Je vous exprime ma profonde gratitude pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail et pour avoir accepté de faire partie du jury en tant que rapporteur.

à Monsieur D. CHEMLA

Je vous remercie d'avoir accepté d'être mon rapporteur. Vos qualités scientifiques donneront autant de valeurs à vos critiques. Je vous prie de trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

à Monsieur le Professeur G. BRULE

Permettez-moi de vous exprimer ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

à Monsieur le Professeur Ghislain HAUDECOEUR

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté au déroulement de ce travail.
Vos conseils et votre gentillesse m'ont toujours été précieux.

à Madame le Professeur R. KRIVOSIC-HORBER

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée quant à la réalisation des tests de diagnostique.

à Monsieur le Professeur C. LEOTY

Que vous soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de lire ce travail et de me faire ainsi bénéficier de vos remarques. Je tiens également à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie très sincèrement Madame Monique ADAMANTIDIS pour l'intérêt qu'elle a porté au déroulement de ce travail. Ses conseils scientifiques et ses remarques m'ont été toujours été très précieux. La clarté de ce travail lui doit beaucoup.

Je remercie :

les Docteurs H. REYFORD , B. TAVERNIER, E. HADDAD, F. TENEUR, M.L. BORTLEIN, F. PUISIEUX,

Monsieur P. DEVOS ,

Mesdames I. STIX, M.C. GUILLAUME, B. DUMOTIER,

qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement Mesdames V. DEHEUNINCK, V. BLAEVOET, V. LAMBERT, J. CAMPOS, N. NATTIER et Monsieur C. SUEUR.

Je n'oublie pas Madame N. PRUVOST qui m'a beaucoup aidé dans la rédaction de ce travail.

A mes parents,

A Charles, Alain, Tony, Kelly, Corine, Thérèse

A mes amis.

En témoignage de ma profonde affection.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
PRESENTATION DU SUJET. 1
CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE SQUELETTIQUE 4
I.1 ULTRASTRUCTURE DE LA CELLULE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE. 5
I.1.1 LES SYSTEMES MEMBRANAIRES. 5
I.1.2 LES MYOFIBRILLES. 5
I.1.3 LES FIBRES MUSCULAIRES LENTES ET RAPIDES. 6
I.2 LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION-RELAXATION. 7
I.2.1 DESCRIPTION D'UN CYCLE CONTRACTILE. 7
I.2.2 ASPECT MECANIQUE DU COUPLAGE CONTRACTION RELAXATION. 8
I.2.3 LES CANAUX CALCIQUES IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION. 9
I.2.3.1 Canal calcique du sarcolemme sensible aux dihydropyridines 9
I.2.3.2 Récepteur à la ryanodine : canaux de relargage de calcium. 10
I.2.4 LES SECONDS MESSAGERS IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION 11
I.2.4.1 Les protéines G. 11
I.2.4.2 Les messagers intracellulaires produits par la phospholipase C (InsP3). 11
I.3 LES MECANISMES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA RELAXATION. 12
I.3.1 AU NIVEAU DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE 12
I.3.1.1 Ca-ATPase du RS. 12

I.3.1.2 Phospholamban. 13
I.3.1.3 Calmoduline. 13
I.3.1.4 Calséquestrine. 13
I.3.2 AU NIVEAU DU SARCOLEMME : ECHANGEUR Na-Ca. 14
I.3.3 AUTRES 14
I.3.3.1 REGULATION LIEE AU FILAMENT FIN 14
I.3.3.2 DETACHEMENT DE PONT ACTINE-MYOSINE 15
I.3.3.2.1 ROLE DE CHAINE LOURDE 15
I.3.3.2.2 CHAINE LEGERE DE LA MYOSINE 16
I.4 FACTEURS INFLUENCANT LA LIBERATION DU CALCIUM PAR LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE. 16
I.4.1 AGENTS INDUCTEURS PHYSIOLOGIQUES POTENTIELS DE LA LIBERATION DU CALCIUM DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE. 17
I.4.1.1 Calcium. 17
I.4.1.2 Inositol 1-4-5-triphosphate. 17
I.4.1.3 Sodium. 18
I.4.1.4 Théorie du voltage sensor. 18
I.4.2 AGENTS PHARMACOLOGIQUES INDUCTEURS DE LA LIBERATION DU CALCIUM. 19
I.4.2.1 Halothane. 19
I.4.2.2 Caféine. 19
I.4.2.3 Ryanodine. 20
I.4.2.4 Anesthésiques locaux. 20
I.4.2.5 Dantrolène. 20

CHAPITRE II : L'HYPERTHERMIE MALIGNNE 21
II.1 DESCRIPTION. 22
II.1.1 HISTORIQUE. 22
II.1.2 DIAGNOSTIC DE LA SENSIBILITE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE. 23
II.1.2.1 Protocole européen. 23
II.1.2.2 Protocole américain. 24
II.1.2.3 Autres tests. 24
II.2 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTHERMIE MALIGNNE. 25
II.2.1 AU NIVEAU CELLULAIRE. 25
II.2.1.1 Sarcolemme. 25
II.2.1.2 Réticulum sarcoplasmique. 25
II.2.1.3 Mitochondrie. 26
II.2.1.4 Type de fibres (lentes ou rapides). 27
II.2.2 AU NIVEAU DE L'ORGANISME ENTIER. 27
II.3 EFFETS PHARMACOLOGIQUES DE L'HALOTHANE 27
II.3.1 SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE NON SENSIBLE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE 27
II.3.2 SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE SENSIBLE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE 28
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES. 30
III.1 PRELEVEMENTS ET PREPARATIONS POUR LES ETUDES REALISEES SUR DES LAMBEAUX MUSCULAIRES. 31
III.1.1 PRELEVEMENTS ET PREPARATIONS 31

III.1.2 CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA SENSIBILITE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE. 32
III.1.3 INDICES MECANIQUES DU COUPLAGE CONTRACTION- RELAXATION 32
III.2 TECHNIQUE DE LA FIBRE PELEE 33
III.2.1 DEFINITIONS ET GENERALITES 33
III.2.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX. 34
III.2.2.1 Préparation et montage des fibres pelées. 34
III.2.2.2 Les solutions utilisées. 35
III.2.2.3 Etude de la réactivité à l'halothane du réticulum sarcoplasmique dépendante du type de fibre musculaire. 36
III.2.2.4 Etude de la sensibilité au calcium des protéines contractiles. 37
III.2.2.5 Effet de l'halothane sur la tension maximale développée par les protéines contractiles squelettiques. 38
III.3.3 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS. 39
CHAPITRE IV : RESULTATS 40
IV.1 EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LE COUPLAGE CONTRACTION- RELAXATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE HUMAIN SENSIBLE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE 41
IV.2 INFLUENCE DU BLOCAGE DU RECAPTAGE DU CALCIUM PAR LA Ca-ATPase RETICULAIRE SUR LES EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LE COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION : EFFETS DE L'ACIDE CYCLOPIAZONIQUE (CPA) 43
IV.2.1 EFFETS DU CPA SUR LA CONTRACTURE. 43
IV.2.2 EFFETS DU CPA SUR LE COUPLAGE CONTRACTION- RELAXATION. 44

IV.2.3 CORRELATION ENTRE LA CONTRACTURE ET LES PARAMETRES MECANIQUES. 45
IV.2.4 DISCUSSION PARTIELLE. 45
IV.3 INFLUENCE DE LA MODIFICATION DE LA PERMEABILITE SARCOLEMMIQUE AU SODIUM SUR LES EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LE COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION : EFFETS DE LA VERATRINE. 47
IV.4 ETUDE DE LA REACTIVITE A L'HALOTHANE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE DEPENDANT DU TYPE DE FIBRE MUSCULAIRE. 49
IV.4.1 CARACTERISTIQUES PHYSIQUES. 49
IV.4.2 SEUIL DE REACTIVITE A L'HALOTHANE DES FIBRES PELEES 50
IV.4.3 DISCUSSION PARTIELLE 50
IV.5. SENSIBILITE AU CALCIUM DES PROTEINES CONTRACTILES 52
IV.5.1 INFLUENCE DE L'HALOTHANE SUR LA REACTIVITE CALCIQUE DES PROTEINES CONTRACTILES. 52
IV.5.2 EFFET DE L'HALOTHANE SUR LA TENSION MAXIMALE DEVELOPPEE PAR LES PROTEINES CONTRACTILES SQUELETTIQUES. 53
IV.5.3 DISCUSSION PARTIELLE 53
CHAPITRE V : CONCLUSION. 55
BIBLIOGRAPHIE 59

PRESENTATION DU SUJET

L'hyperthermie maligne (HM) est une maladie génétique d'expression musculaire. Le mode de transmission se fait le plus souvent sur un mode autosomique dominant (50 à 80 % des familles) et dans d'autres cas selon un mode de type récessif multifactoriel. Chez l'homme, un ou plusieurs gène(s) situé(s) sur le chromosome 19 (région q13-1) semble(nt) se transmettre avec le ou les phénotype(s) HM et cette région code également le canal réticulaire ryanodine-dépendant. L'incidence de la crise d'hyperthermie maligne déclenchée par l'anesthésie est d'environ 1 sur 15 à 50 000 anesthésies. L'HM est déclenchée par l'administration de certains agents anesthésiques (anesthésiques halogénés). Sur le plan clinique l'HM se caractérise par une hyperthermie majeure, une rigidité musculaire et une acidose. Le muscle squelettique est le siège d'un syndrome d'hypercatabolisme cellulaire intense et brutal. Le muscle squelettique sensible à l'HM présente une contracture anormale à l'halothane et un seuil de contracture plus bas à la caféine par rapport à celui relevé sur un muscle non sensible. Bien que le caractère multigénique de l'HM ait été prouvé, son expression phénotypique demeure la contracture.

Il est admis que dans l'HM une anomalie des systèmes membranaires en particulier du réticulum sarcoplasmique est à l'origine de l'hypermotilité à l'halothane et, plus généralement aux agents déclenchants. Sur le plan physiopathologique, les mécanismes régulateurs présidant à l'augmentation du calcium intracellulaire pendant la contraction musculaire, et ceux responsables de la relaxation par diminution de la concentration calcique intramyoplasmique sont perturbés. Cette gestion dysharmonique du calcium par la cellule se traduit sur le plan mécanique par une modification du couplage contraction-relaxation. Jusqu'à présent les propriétés mécaniques intrinsèques du muscle sensible à l'HM n'ont pas été étudiées.

Ce travail se propose d'essayer de mieux comprendre la physiologie et la physiopathologie du muscle sensible à l'HM en étudiant les propriétés mécaniques du muscle squelettique de sujets porteurs de l'anomalie.

La première partie de ces travaux expérimentaux a pour but : (1) de préciser le mécanisme d'action de l'halothane associé ou non à d'autres agents pharmacologiques (vératrine, agoniste sodique; acide cyclopiazonique, inhibiteur du recaptage du calcium) sur la contractilité intrinsèque du muscle squelettique des sujets sensibles à l'HM et des sujets non sensibles ; (2) d'apprécier le

degré de coordination qui pourrait exister entre l'altération des paramètres de relaxation et la contracture chez les sujets sensibles à l'HM.

La deuxième partie des résultats est consacrée : (1) à étudier la réactivité à l'halothane des fibres musculaires de sujets sensibles à l'hyperthermie maligne (HM) et de sujets non sensibles ; (2) à rechercher l'effet de l'halothane sur les protéines contractiles du muscle squelettique normal.

CHAPITRE I

PHYSIOLOGIE DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE SQUELETTIQUE

I.1 ULTRASTRUCTURE DE LA CELLULE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE.

Le muscle squelettique est capable de réaliser des mouvements contractiles très rapides sous contrôle volontaire. La succession de ses états de contraction et de relaxation est régie par un système très efficace qui met en jeu des organites spécialisés de la cellule musculaire.

I.1.1 LES SYSTEMES MEMBRANAIRES.

Le muscle squelettique est constitué de fibres musculaires cylindriques de 1 à 40 mm de longueur, pour un diamètre de 50 à 100 μm . Les fibres musculaires, polynucléées, sont contenues dans une membrane très fine, le sarcolemme. Le sarcolemme de la cellule musculaire constitue la membrane plasmique qui s'invagine au niveau de chaque sarcomère pour former un réseau membranaire de tubules transverses entourant chaque myofibrille. Les régions où le système tubulaire est en étroite contiguïté avec certaines parties renflées du réticulum sarcoplasmique (ou citernes) sont appelées triades. Ces triades constituent l'élément clef du couplage excitation-contraction (figure 1).

I.1.2 LES MYOFIBRILLES.

Chaque fibre musculaire contient de nombreuses myofibrilles (1 à 2 μm de diamètre) disposées parallèlement les unes aux autres dans le sarcoplasme. Les myofibrilles sont constituées elles-même d'unités contractiles appelées sarcomères qui possèdent au repos une longueur d'environ 2,5 μm . Elles sont composées de deux types de myofilaments, fins (actine) et épais (myosine), disposés parallèlement. Cette structure régulière donne lieu à l'aspect strié si caractéristique de ce type de muscle (figure 1). Un sarcomère se compose d'une bande sombre (bande A) entourée d'une bande claire (bande I). Une ligne dense située au centre des bandes I (strie Z) sépare un sarcomère du suivant. Chaque sarcomère renferme les deux sortes de protéines contractiles : d'une part le filament fin ou filament d'actine, formé de deux hélices de monomères d'actine G (PM 47 KDa) polymérisés en actine, mesurant 1 μm de long et s'insérant sur les stries Z ; d'autre part la myosine constituant les filaments épais (PM 500 KDa) et

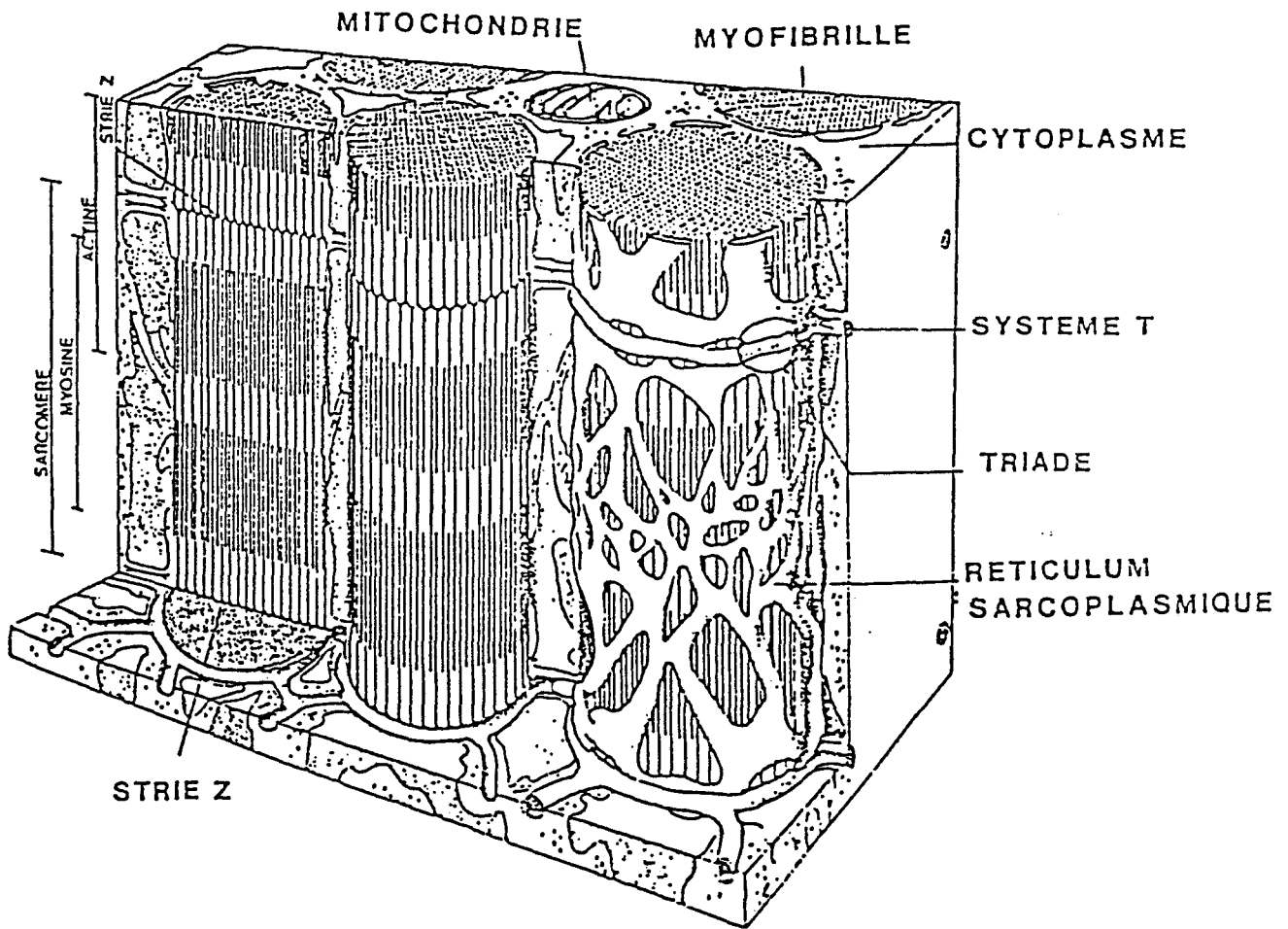


FIGURE : 1

Illustration de la structure interne d'une portion de fibre musculaire squelettique.

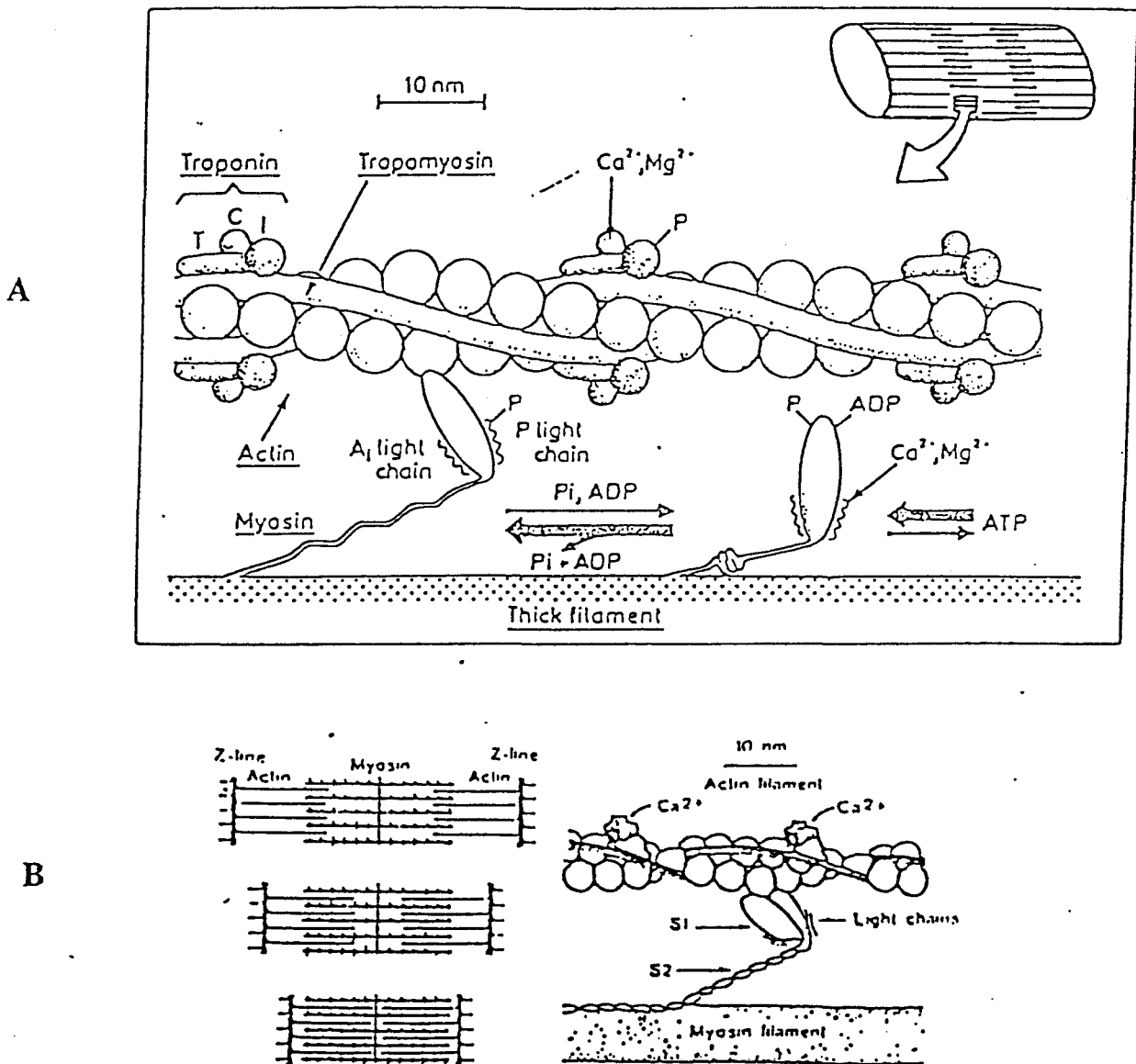


FIGURE 2 : A : Représentation schématique d'une interaction entre les filaments fin et épais lors de la contraction. B : schéma du sarcomère.

(d'après DE MEIS et coll . 1979)

composée de deux parties (figure 2) : une partie allongée et une partie globulaire elle-même pourvue de deux têtes semblables. Cette partie globulaire (fragment S1) joue un rôle essentiel dans la régulation de la contraction du muscle. C'est au niveau de ce fragment S1 que se localise l'activité ATPasique de la myosine et que la molécule d'actine vient se fixer à celle de la myosine permettant ainsi la constitution des ponts actine-myosine. La rotation des têtes de la myosine ainsi fixée à l'actine engendre un raccourcissement avec glissement progressif des filaments fins entre les filaments épais (théorie des filaments glissants de HUXLEY, 1957). Le calcium joue un rôle essentiel dans ce mécanisme. La fixation du calcium sur la troponine C induit un changement conformationnel et une modification spatiale des protéines contractiles régulatrices (tropomyosine et complexe troponine) nécessaire pour l'interaction actine-myosine .

I.1.3 LES FIBRES MUSCULAIRES LENTES ET RAPIDES.

En 1873 RANVIER rapporte pour la première fois l'existence chez le lapin de muscles squelettiques les uns à contraction rapide, les autres à contraction lente qui se différencient respectivement par leur couleur blanche ou rouge. Depuis le siècle dernier, les techniques histochimiques, biochimiques et ultrastructurales ont permis d'identifier et de classer les types de fibres selon leur activité contractile liée à l'activité ATPasique de la myosine et leur capacité oxydative et glycolytique (PETER et coll. 1972 ; BARNARD et coll. 1971). La faible activité des enzymes (phosphorylase, et α -glycérophosphate-déshydrogénase) révèle une activité aérobie oxydative, caractéristique majeure des fibres de type I "fibre lente oxydative". Par contre une forte activité enzymatique (phosphorylase et α -glycérophosphate-déshydrogénase) révèle une activité anaérobie ou glycolytique, caractéristique des fibres de type IIa "rapide-oxydative-glycolytique" et les fibres de type IIb "rapide-glycolytique" (PETER et coll., 1972). La plupart des muscles contiennent les trois types de fibres musculaires avec une prédominance pour l'un des trois types. Leurs différentes caractéristiques biologiques sont résumées dans le tableau 1. L'activité ATPasique de la myosine dans les fibres rapides (type II) est trois fois plus élevée que celle observée chez les fibres lentes (type I). Les fibres rapides ont d'une part une capacité d'accumulation du calcium dans le réticulum sarcoplasmique 4 à 11 fois plus importante que les fibres lentes (SALVIATI et coll., 1982) et d'autre part une vitesse

Tableau 1 : Propriétés dépendantes du type de fibre musculaire chez le mammifère (inter. = intermédiaire)

	Fibre lente	Fibre intermédiaire	Fibre rapide
	Type I, oxydative	Type IIA, oxydative-glycolytique	Type IIB glycolytique
Couleur	rouge (myoglobine)	rouge	blanche (absence de myoglobine)
Diamètre	grand	inter.	petit
Capillaires	nombreux	inter.	peu nombreux
Mitochondries	nombreuses	inter.	peu nombreuses
Activité myosine ATPase	faible	importante	importante
Fatigabilité	résistant	inter.	sensible
Vitesse de contraction	lente	rapide	rapide

d'hydrolyse de l'ATP (cinétique de la Ca-ATPase) plus grande que celle des fibres lentes (WANG 1979). L'activité de la Ca-ATPase dans les fibres de type II est nettement plus grande que celle des fibres de type I. Des expériences portant sur la transformation d'un type de fibre en un autre ont montré que l'activité de la Ca-ATPase reflétait la nature de la fibre. C'est au cours de la différenciation du muscle que le développement de l'activité contractile s'accompagne d'une augmentation massive de l'activité de la Ca-ATPase du réticulum sarcoplasmique (MARTONOSI et coll., 1982 ; MARTONOSI , 1984). Ces observations indiquent que l'activité du transporteur Ca-ATPase dans une cellule musculaire est liée à son activité contractile selon un mécanisme qui n'est pas défini (MARTONOSI et coll., 1983). SALVIATI en 1982 a montré grâce à l'analyse électrophorétique que les chaînes légères de la myosine étaient spécifiques à chaque type de fibre.

I.2 LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION-RELAXATION.

I.2.1 DESCRIPTION D'UN CYCLE CONTRACTILE.

Le muscle squelettique se contracte en réponse à un stimulus naturel ou artificiel. L'acétylcholine (neurotransmetteur) libéré au niveau de la jonction neuromusculaire dépolarise le sarcolemme en augmentant la perméabilité aux ions sodiques. Cette dépolarisation induit un potentiel d'action qui se propage le long de la fibre musculaire. Le processus électrique d'excitation, arrivant par le système tubulaire transverse (système T), dépolarise les membranes cisternales (citerne terminale) du réticulum sarcoplasmique et déclenche une libération brutale d'ions calcium dans le sarcoplasme. Ces ions calcium catalysent à leur tour une réaction enzymatique (hydrolyse de l'ATP) et mettent en jeu l'interaction myosine-actine pour aboutir ainsi à la contraction. Le relâchement du muscle est assuré par la reprise active des ions calcium par les pompes Ca-Mg-ATPase du réticulum sarcoplasmique longitudinal. Le réticulum sarcoplasmique (RS) joue un rôle capital dans la contraction et la relaxation du muscle strié de mammifère adulte. Une faible augmentation du calcium cytosolique induit secondairement la libération d'une forte quantité de calcium du RS suffisante pour provoquer de la contraction des myofilaments. Les systèmes responsables de l'augmentation du calcium cytosolique lors de la

contraction sont en équilibre étroit avec les systèmes régulant la décroissance calcique lors de la relaxation.

I.2.2 ASPECT MECANIQUE DU COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION.

La réponse mécanique du muscle obtenue par stimulation électrique est classiquement divisée en deux phases : contraction et relaxation. Les propriétés mécaniques de la première phase ont fait l'objet d'une analyse rigoureuse (JEWELL & WILKIE, 1958; 1960), et nombreuses sont les informations concernant le développement de la force. La théorie de la dynamique mécanique du muscle strié établie par HILL (1938) et approfondie par (JEWELL & WILKIE, 1958) repose sur l'analyse des variations de longueur et de la force musculaire au cours du temps. Lorsqu'un muscle est soumis à une post-charge, c'est-à-dire à une charge additionnelle, il développe une force susceptible de vaincre la post-charge avant de se raccourcir. Il faut souligner que, lors du raccourcissement, le muscle conserve cette force développée constante et égale à la post-charge sur tout le parcours de la contraction isotonique. Contrairement au muscle isolé entier, il n'y a pas, au niveau des sarcomères squelettique et cardiaque, de phase purement isotonique ni de phase purement isométrique : les sarcomères ont un comportement auxotonique. Plus la post-charge augmente plus le raccourcissement devient faible au niveau des sarcomères (LECARPENTIER et coll. 1985). En présence de fortes concentrations en calcium, le raccourcissement de fibres pelées est proportionnel à la force développée et plus généralement un changement de force est associé à une variation de la longueur au niveau des sarcomères (HELLAM, PODOLSKY, 1968 ; GORDON, HUXLEY & JULLIAN 1966).

Les travaux princeps de HILL (1949) et JEWELL & WILKIE (1960), ont permis une analyse rigoureuse en terme mécanique de la relaxation du muscle squelettique. Au cours de la relaxation, le muscle revient à ses conditions initiales de longueur et de tension c'est-à-dire à sa précharge. La relaxation isométrique est caractérisée par une décroissance de la tension jusqu'à sa valeur de précharge. La décroissance de la tension se déroule dans un premier temps de manière rapide, puis chute à une vitesse beaucoup plus lente. Cette seconde phase est d'allure monoexponentielle. Le temps de demi-relaxation ($T_{1/2}$) est retenu comme caractéristique de la

relaxation isométrique. Bien que la tension à un moment précis après le stimulus dépende des variables mécaniques qui sous-tendent le muscle, il faut noter que la constante de temps est indépendante de ces variables dans le muscle squelettique (JEWELL & WILKIE, 1958).

La performance de la phase de relaxation est appelée lusitropie (KATZ, 1990). La relaxation est susceptible d'être modifiée par les conditions de charge, de raccourcissement et les agents pharmacologiques (CHEMLA et coll., 1986; KATZ, 1990). Toute augmentation de l'amplitude de la contraction est suivie d'une accélération de la relaxation, ce dont rend compte l'étude du couplage mécanique existant entre la contraction et la relaxation (VITTONI et coll. 1985).

I.2.3 LES CANAUX CALCIQUES IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION.

I.2.3.1 Canal calcique du sarcolemme sensible aux dihydropyridines.

La structure oligomérique du canal calcique du muscle squelettique est formée de 5 sous-unités. La sous-unité $\alpha 1$ est la principale sous-unité qui comporte 3 sites récepteurs sensibles à la 2,4-dihydropyridine (DHP), à la phénylalkylamine (PA) et à la benzothiazépine (BT). Ces 3 sites ont des conformations allostériques. Des travaux de séquençage (TANABE et coll., 1987 ; ELLIS et coll., 1988) ont montré l'existence de 4 sous-domaines hydrophobes répétés dans 6 domaines constitués de structures en hélice α transmembranaire (figure 3). La composition structurale de la sous-unité $\alpha 1$ (155 KDa) permet de penser qu'elle est à la fois conductrice pour les ions Ca^{2+} et sensible au potentiel de membrane (JAHN et coll. 1988). La sous-unité β (54KDa) cytoplasmique et la sous-unité γ (33KDa) transmembranaire interviendraient dans la régulation du fonctionnement de la sous-unité $\alpha 1$ (LEUNG et coll. 1987, 1988). Les sous-unités $\alpha 2$ et δ respectivement de 143 et 27 KDa sont fortement glycosylées (JAHN et coll. 1988 ; JAY et coll. 1991). FLOCKERSI et coll. (1986 a et b) ont montré que certains des récepteurs DHP (purifiés à partir de muscle squelettique de mammifère et incorporés dans des bicouches lipidiques) présentent une activité de type canal calcique lent qui présente les propriétés suivantes :

- activé par le potentiel ("voltage"-dépendance)
- activé par les phosphorylations des kinases cAMP-dépendantes

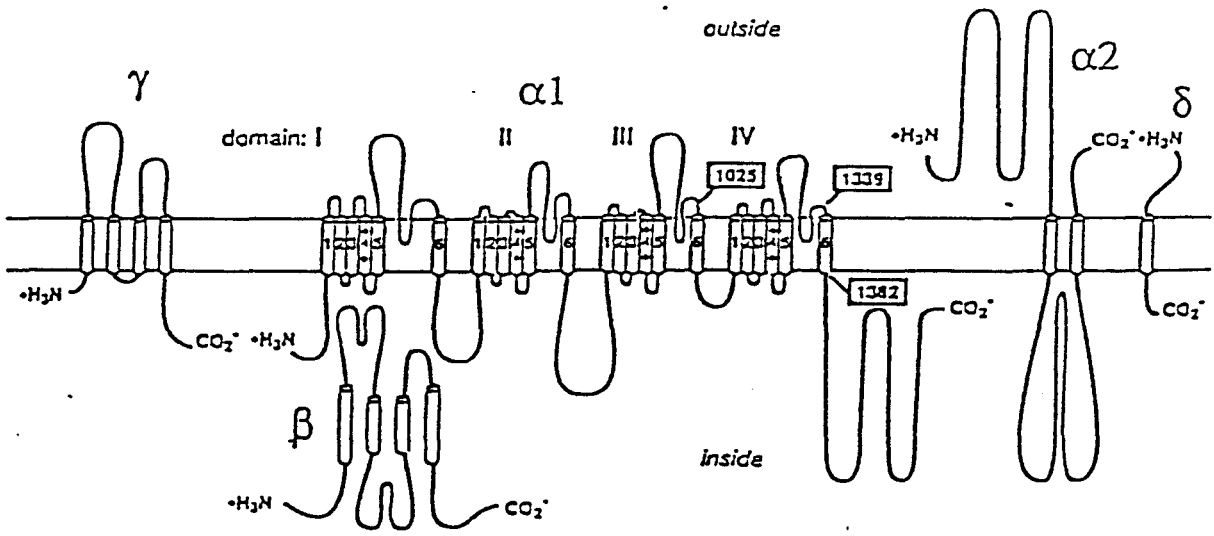
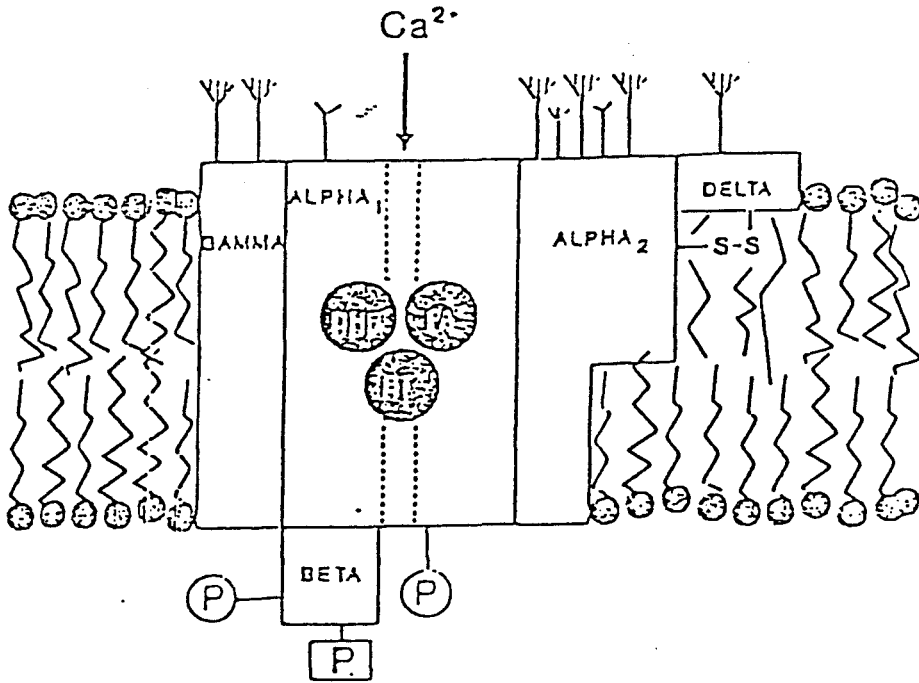


FIGURE 3 : Modèle schématique du canal sensible aux dihydropyridines. (A) : structure des différentes sous-unités du canal calcique; (B) : arrangement transmembranaire des différentes sous-unités.

(d'après GLOSSMANN et STREIENNIG, 1990 ; CATTERAL et STREIENNIG 1992)

- inactivé par une augmentation du calcium intracellulaire
- activé par les agonistes calciques comme le Bay K 8644 (DHP)
- inhibé par les antagonistes calciques comme la nifédipine et la nitrendipine (DHP)

I.2.3.2 Récepteur à la ryanodine : canaux de relargage de calcium.

La ryanodine est une substance alcaloïde d'origine végétale utilisée autrefois comme insecticide. La ryanodine est connue pour modifier le couplage excitation-contraction des muscles striés. Des travaux électrophysiologiques ont montré que la ryanodine n'affecte ni les phénomènes électriques de la membrane de surface, ni l'activité de la pompe Ca^{2+} -ATPase du RS, mais qu'elle interfère spécifiquement avec le processus de libération du calcium (SUTKO et coll. 1983). L'utilisation de ryanodine tritiée a permis d'identifier les canaux de relargage du calcium dans des préparations de citernes terminales solubilisées. Selon INUI et coll. (1987), trois sous-unités protéiques de PM 360, 330 et 170 KDa fixent la ryanodine. Les protéines de PM 360 KDa sont présentes dans les préparations de triades mais absentes de celles des tubules transverses et du réticulum longitudinal. Incorporées dans les bicouches lipidiques, ces protéines ont toutes les caractéristiques d'un canal calcique fonctionnel.

L'aspect en microscopie électronique de ces protéines incorporées dans les bicouches lipidiques est celui d'un trèfle à quatre feuilles, typique des protéines-pied ("feet-structure") qui traversent la membrane du RS jonctionnel et des tubules T (BLOCK et coll. 1988; TAKESHIMA et coll. 1989). La ryanodine agit sur le relargage du calcium présent dans les citernes terminales : à forte concentration ($> 50 \mu\text{M}$), l'interaction avec un site de basse affinité induit la fermeture du canal et une inhibition de la libération rapide de calcium par le RS. A faible concentration ($< 50 \mu\text{M}$), la ryanodine se fixe sur un site de haute affinité (PESSAH et coll., 1986) et active le transport de calcium en maintenant les canaux de relargage en position ouverte (MEISSNER 1986a). Des expériences de membrane artificielle, permettant d'enregistrer l'activité électrique de canaux sélectifs des cations divalents (LAI et coll., 1988 ; SMITH et coll., 1988; ANDERSON et coll., 1989), ont montré qu'en l'absence de calcium, cette structure protéique peut également conduire des cations monovalents Na^+ ou K^+ (ANDERSON et coll., 1989 ; RADON et coll., 1990). Selon BRUM et coll. (1987), le récepteur de la ryanodine pourrait être en relation avec

des protéines du système T qui seraient sensibles aux variations du champ électrique résultant du potentiel d'action (notion de "voltage-sensor").

I.2.4 LES SECONDS MESSAGERS IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

Les cellules communiquent entre elles par l'intermédiaire de messagers (hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance). Ces messagers sont reconnus par des récepteurs membranaires dont la stimulation induit une cascade d'évènements biochimiques qui aboutissent à un changement d'une ou de plusieurs propriétés de la cellule (contraction, division cellulaire et besoin énergétique). Le récepteur activé interagit avec une protéine G qui va modifier l'activité d'une ou de plusieurs enzymes aussi diverses que l'adénylate cyclase, la phospholipase C ou la phospholipase A2.

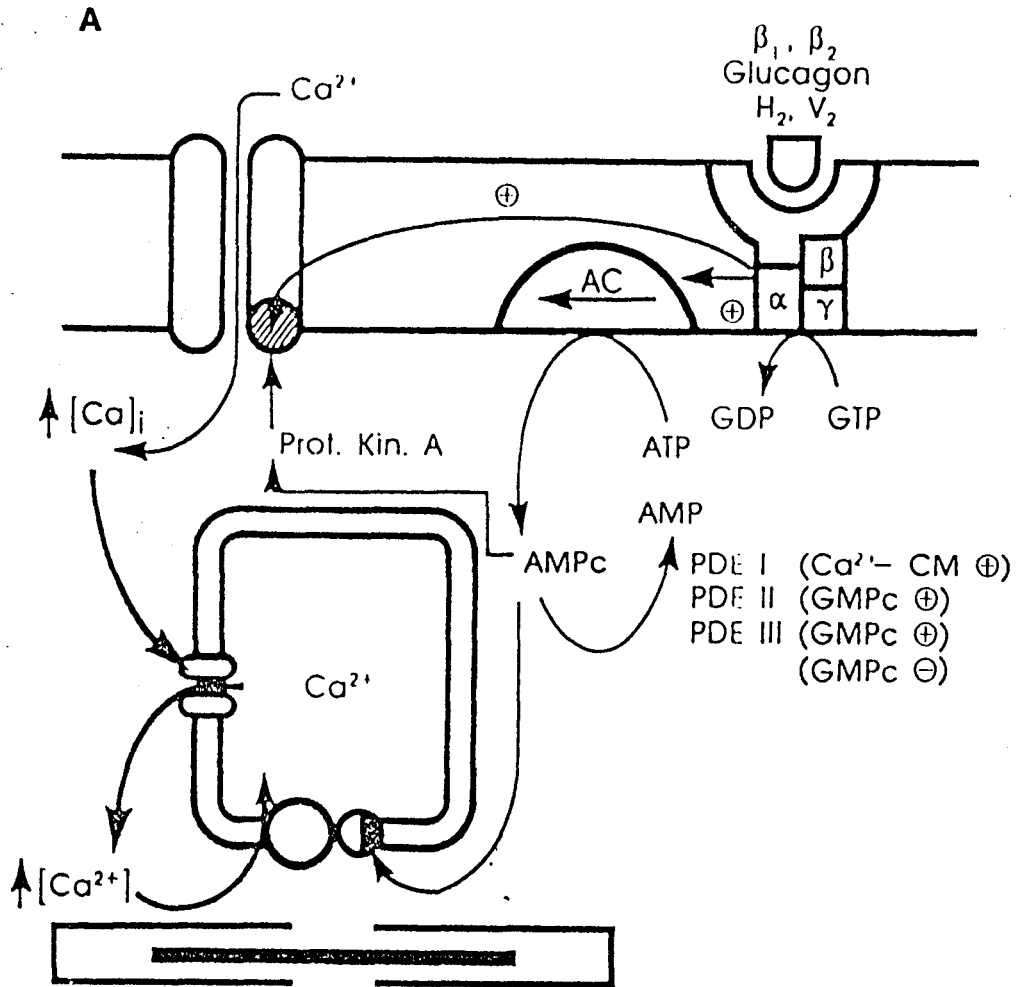
I.2.4.1 Les protéines G.

Une protéine G (liant le GTP) est un complexe de 3 sous-unités α , β , γ . Il existe plusieurs types de protéines G qui ont en commun les sous-unités β et γ , et qui se distinguent par leur forme α : α_s (stimulatrice), α_i (inhibitrice), α_t (transducine) (NEER et coll. 1988). Il est maintenant établi qu'une fois activée par le récepteur, (figure 4 A), la protéine G qui lui est spécifiquement associée va modifier l'activité d'une ou de plusieurs enzymes aussi diverses que l'adénylate cyclase, les phospholipases C ou A2 ou une phosphodiesterase activée par le GMPc.

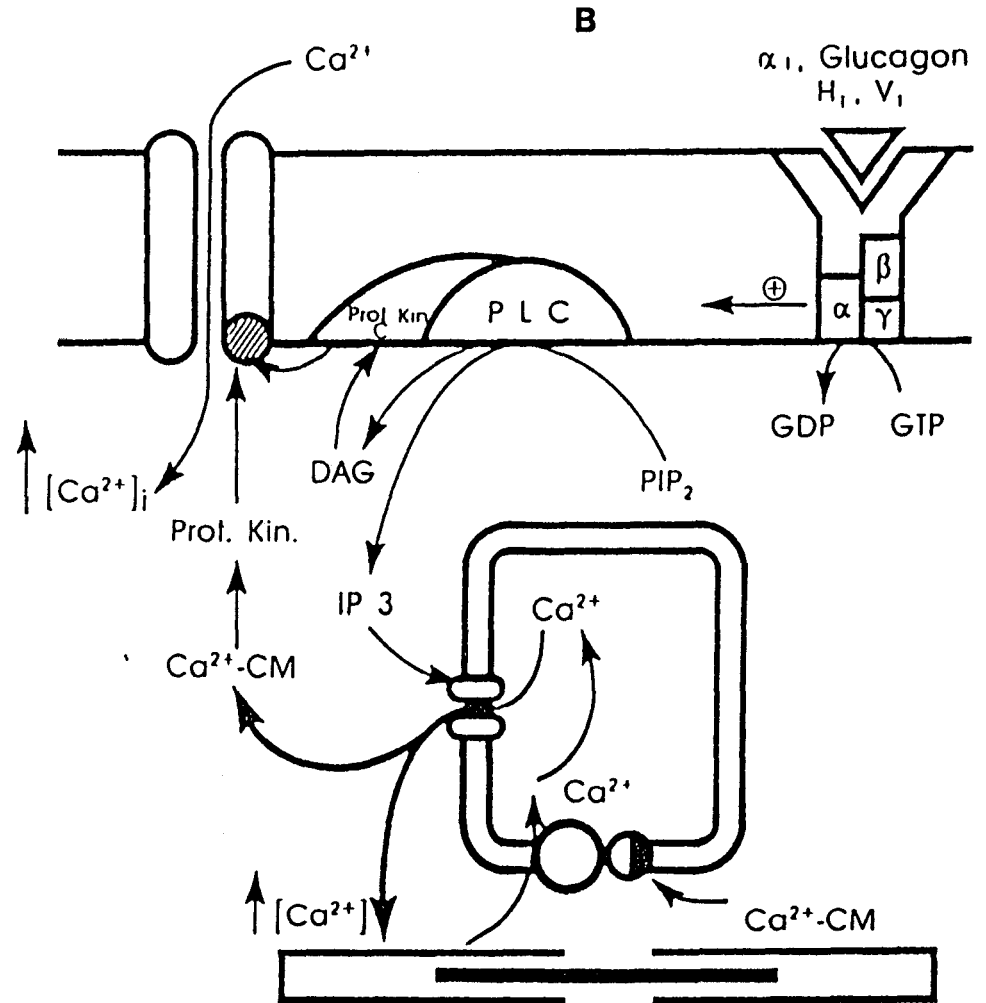
I.2.4.2 Les messagers intracellulaires produits par la phospholipase C (InsP3).

Ce mécanisme implique un récepteur qui, par l'intermédiaire d'une protéine G, contrôle l'activité d'une phosphodiesterase membranaire (phospholipase C) qui coupe un phospholipide du feuillet interne de la membrane plasmique pour produire d'une part, le diacyl-glycérophosphate (DG) et d'autre part, l'inositol 1-4-5-trisphosphate (InsP3) (figure 4 B) (BERRIDGE, 1987). Le DG active la protéine kinase C. L'InsP3 contrôle l'activité du canal calcique située sur le réticulum sarcoplasmique (RS) et permet la libération du calcium dans le sarcoplasme.

Figure 4: Représentation schématique du rôle de l'AMPc et de l'InsP3 dans le couplage excitation - contraction.



Voie de l'AMP cyclique



Voie de l'inositol-triphosphate et du diacyl-glycérol

I.3 LES MECANISMES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA RELAXATION.

I.3.1 AU NIVEAU DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE

I.3.1.1 Ca^{2+} -ATPase du RS.

La pompe à calcium ou Ca^{2+} -ATPase-Mg-dépendante constitue l'une des principales protéines du RS. Le transport du calcium se fait contre un gradient de concentration grâce à l'hydrolyse de l'ATP par une ATPase Ca^{2+} -Mg- dépendante (Ca^{2+} -ATPase) dont l'activité est régulée dans le muscle strié par la phosphorylation du phospholamban. Cette pompe transporte 2 ions de calcium par molécule d'ATP hydrolysée. Le transport du calcium par le RS est identique dans le muscle squelettique et dans le muscle cardiaque. Cependant il est régulé dans le coeur par des phosphorylations dépendantes de protéines kinases (MOVSESIAN et coll., 1984 ; TADA et coll., 1982) qui agissent par l'intermédiaire du phospholamban.

La Ca^{2+} -ATPase du RS est une chaîne polypeptidique formée de trois domaines cytoplasmiques et reliée à dix domaines transmembranaires en hélice α par un pied formé de cinq hélices sur lesquelles viennent se fixer les ions de calcium (Mac LENNAN et coll., 1985 ; BRANDL et coll., 1986). La fixation d'ATP sur l'un des domaines cytoplasmiques provoque la phosphorylation d'un aspartate du domaine voisin, ce qui induit la translocation du calcium fixé sur le pied en hélice. Deux isoformes sont exclusivement exprimées dans le muscle squelettique rapide : l'une est spécifique du muscle adulte, l'autre du muscle néonatal. Ces deux protéines, codées par le même gène, sont produites par un épissage alternatif de l'avant dernier exon et ne diffèrent que par leurs derniers acides aminés (KORCZAK et coll. 1988). Un autre gène code pour deux autres protéines, l'une exprimée dans le coeur adulte, le muscle squelettique lent adulte et le muscle squelettique foetal (BRANDL et coll. 1987) ; l'autre est exprimée dans le muscle lisse et les tissus non musculaires (GUNTESKI-HAMBLIN et coll 1988).

La translocation du calcium à travers la membrane du RS fait intervenir une série de réactions complexes au cours desquelles différents intermédiaires phosphorylés sont formés puis dégradés (TADA et coll. 1978 ; INESI et coll. 1990). Des modifications de nature allostérique induisent une transition de l'ATPase d'un état à forte affinité pour le calcium vers un état à faible

affinité et conduisent à la translocation du calcium de l'extérieur vers la lumière du RS. L'ATP fournit l'énergie nécessaire à l'accumulation active du calcium. A forte concentration il aurait un rôle dans la régulation allostérique du transport du calcium (INESI et coll. 1990).

I.3.1.2 Phospholamban.

Le phospholamban est localisé dans la membrane du RS longitudinal. Le phospholamban a été initialement décrit dans le coeur. Il est également présent dans les muscles squelettiques lents et les muscles lisses (JORGENSEN et coll. 1986 ; JUJII et coll. 1988) mais il est absent des fibres musculaires rapides (JORGENSEN et coll. 1986). La phosphorylation du phospholamban par des kinases cAMP ou cGMP-dépendantes, protéines kinases-C et Ca^{2+} -Calmoduline est associée à une augmentation de l'activité de la Ca^{2+} -ATPase et se traduit par une accélération de la relaxation appréciée par exemple sur la diminution du temps de demi-relaxation en isométrie.

I.3.1.3 Calmoduline.

C'est une protéine activatrice de la Ca^{2+} -ATPase-Mg-dépendant qui augmente l'affinité du calcium. La calmoduline a été mise en évidence sur les vésicules isolées de réticulum sarcoplasmique (MEISSNER, 1986b) bien que sa capacité activatrice de la pompe Ca-ATPase n'ait pas été retrouvée (CAMPBELL & Mac LENNAN, 1981 ; CHIESI & CARAFOLI, 1982, 1983 ; SEILER et coll., 1984). Selon MEISSNER (1986b), la calmoduline serait impliquée dans l'inhibition ou la modulation de la libération du calcium plutôt que dans l'activation de la pompe Ca-ATPase. Toutefois son action serait indépendante des protéines-calmoduline-kinases (SMITH et coll., 1989).

I.3.1.4 Calséquestrine.

Elle est présente dans le muscle squelettique, le muscle cardiaque et le muscle lisse où elle est localisée dans la lumière des citernes terminales du RS (JORGENSEN et coll. 1983, 1984). La calséquestrine sert de transporteur de calcium à l'intérieur du RS, permettant ainsi de réduire

le gradient contre lequel la Ca^{2+} -ATPase doit elle-même transporter le calcium. De plus, elle permet de concentrer le calcium dans une région précise, la citerne terminale (MITCHELL et coll. 1988). Il semble bien qu'elle soit impliquée dans le relargage du calcium au moment de la contraction mais son rôle dans ce phénomène n'est pas encore bien établi.

I.3.2 AU NIVEAU DU SARCOLEMME : ECHANGEUR Na^+ - Ca^{2+} .

Pendant la relaxation, le myocyte doit extruder rapidement du sarcoplasme une quantité de calcium équivalente à celle ayant pénétré pendant la contraction. L'échangeur Na^+ - Ca^{2+} et une ATPase spécifique du calcium assurent principalement l'extrusion du Ca^{2+} . L'échangeur Na^+ - Ca^{2+} a un rôle important dans la relaxation via l'extrusion du calcium en échange d'une entrée de Na. Il est électrogénique avec une stœchiométrie de 3 Na^+ pour 1 Ca^{2+} et son fonctionnement dépend du potentiel de membrane. En présence d'un réticulum sarcoplasmique fonctionnel, l'extrusion du Ca^{2+} via l'échangeur Na^+ - Ca^{2+} permettrait d'ajuster le bilan calcique transmembranaire en fin de relâchement pour équilibrer les sorties par la Ca^{2+} -ATPase sarcolemmiques et les entrées par le courant calcique lent évitant ainsi une surcharge calcique progressive.

I.3.3 AUTRES

I.3.3.1 Régulation liée au filament fin

Quand le taux de calcium augmente celui-ci se lie à la troponine-C (TNC) entraînant un déplacement stérique et stœchiométrique des autres sous unité du complexe troponine et des molécules de tropomyosine qui lui sont associés. Ceci libère les sites d'interaction entre actine et myosine. Lors du recaptage du Ca^{2+} par le RS, le complexe troponine-tropomyosine (TNI, TNC, TNT) retrouve sa position initiale. La régulation liée au filament fin module rapidement le cycle contraction-relaxation.

La force générée dépend de la quantité de calcium libre disponible pour l'activation des myofilament, elle même déterminée par l'affinité de la TNC par le calcium. De nombreux facteurs sont susceptibles de modifier la relation entre la force générée et la quantité de calcium [Force-pCa (-log (Ca))] : (1) la phosphorylation de TNI diminue la sensibilité du calcium de fibre

musculaire striée. Il est généralement admis que l'accélération de la relaxation induite par les substances β – agonistes ou le forskolin est due en partie à cette phosphorylation ; (2) l'augmentation de la longueur de sarcomère (HIBBER and JEWELL, 1981) augmente la sensibilité de myofilament au calcium. Les modifications induites par les variations de longueur sur la courbe Force-pCa sont complexes et ne font pas intervenir la TNI. Ainsi il a été observé un déplacement de la courbe vers la gauche (augmentation de l'affinité) et une modification de la forme globale de la courbe sans augmentation de la force maximale pour des concentrations en calcium élevées). La longueur dépendance de l'activation est moins importante dans le muscle squelettique que celui observé sur le muscle cardiaque (ALLEN, and KENTISH 1985 ; STEPHENSON and WEND 1984). Selon HOFFMAN et FUCH 1987a, l'affinité de la TNC pour le calcium augmente avec la longueur du sarcomère et cette longueur-dépendance dépend du nombre de ponts attachés (ZOT and POTTER 1989). Au niveau de ces sites, la cinétique de fixation et de libération déterminent la contraction et la relaxation ; (3) une augmentation du pH (alcalose) augmente la sensibilité au calcium du TNC, inversement une diminution de la sensibilité au calcium est observée lors d'une acidification. De même une augmentation de la concentration de phosphate inorganique diminue la sensibilité au calcium avec une diminution de la force maximale calcium activée ; (4) la température, la force ionique, la phosphorylation des chaînes légères de la myosine, la concentration en magnésium adénosine trisphosphate, viscosité, hypoxie, modifient la sensibilité au calcium. Les inhibiteurs des phosphodiésterases (caféine, théophylline) et les agonistes alpha-adrénergiques augmentent la sensibilité au calcium .

I.3.3.2 Détachement de pont actine-myosine

I.3.3.2.1 Rôle de chaîne lourde de la myosine

Rappelons que le raccourcissement du muscle est dû au glissement des filaments fin et épais. Le site enzymatique et les sites de fixation à l'actine sont situés au niveau de la tête de myosine. L'hydrolyse de l'ATP par la myosine ATPase permet l'attachement des têtes de myosine au filaments d'actine et la formation des ponts actine-myosine. Ainsi toute augmentation de l'activité ATPasique de la myosine va tendre à raccourcir la durée du cycle des ponts actine-myosine. De même une diminution de l'activité ATPasique de la myosine devrait théoriquement

retarder le déclin de la force et peut être le ralentir). La vitesse de recyclage des ponts est corrélée à l'activité ATPasique de la myosine dont le meilleur reflet sur un plan mécanique est la vitesse maximale d'une contraction à charge nulle (V_{max}) (LECARPENTIER et coll. 1987). La vitesse de l'ATPase est fonction de la nature des chaînes lourdes de myosine et des isoformes. Ainsi l'isoforme dite rapide V1 (dimère $\alpha\alpha$) a une activité ATPasique élevée et une vitesse d'hydrolyse environ trois à cinq fois supérieure à celle des dimères $\beta\beta$ (isoforme V3 dite lente).

I.3.3.2.2 Chaîne légère de la myosine

Il existe quatre chaînes légères par molécule de myosine. Les chaînes légères sont de deux types : les MLC1 et les MLC3 alcalines et les MLC2 phosphorylables. Dans le tissu cardiaque seules sont exprimées les MLC1 et MLC2, MLC3 étant une isoforme spécifique de muscle squelettique de type rapide. La structure et l'organisation des gènes codant pour les chaînes légères alcalines a été particulièrement étudiée chez le lapin dans le muscle squelettique rapide (STREHELER et coll. 1985). Inversement, les gènes codant pour les chaînes légères régulatrices MLC2 sont moins connues. Cependant, elles appartiennent à la famille de calciprotéines. Le rôle précis de ces chaînes régulatrices reste à définir, cependant dans le système musculaire lisse le complexe calcium-calmoduline active une protéine kinase phosphorylant ces chaînes ce qui déclenche l'hydrolyse de l'ATP par la myosine.

I.4 FACTEURS INFLUENCANT LA LIBERATION DU CALCIUM PAR LE RETICULUM SARCOPLASMIQUE.

La quantité de calcium contenue dans le réticulum sarcoplasmique résulte de l'équilibre permanent entre d'une part, l'influx de calcium du cytoplasme vers la lumière du réticulum sarcoplasmique et les différentes calciprotéines se trouvant à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique et d'autre part, l'efflux du calcium libéré du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme. S'il est admis que la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique est une étape clef du couplage entre l'excitation et la contraction du muscle, le mécanisme précis "in fine" qui régit ce processus de libération, est complexe. De ce fait, il apparaît nécessaire de rappeler les

différents agents qui induisent une libération du calcium selon des mécanismes qui peuvent être interdépendants.

I.4.1 AGENTS INDUCTEURS PHYSIOLOGIQUES POTENTIELS DE LA LIBERATION DU CALCIUM DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE.

I.4.1.1 Calcium.

Les travaux princeps montrant la libération de calcium provoquée par du calcium ("calcium-induced calcium release") furent réalisés simultanément par différents auteurs (FORD et PODOLSKY, 1970 ; ENDO et coll. 1970 ; FABIATO & FABIATO, 1972). Bien que le rôle physiologique soit encore discuté (ENDO 1977) la libération du calcium induite par le calcium a été largement étudiée sur fibre pelée de muscle squelettique (STEPHENSON, 1981) et sur vésicules de réticulum sarcoplasmique isolées du muscle squelettique (MIYAMOTO et RACKER, 1981 ; KIM et coll. 1983 ; MEISSNER et coll. 1986). La vitesse de libération du calcium induite par le calcium (VOLPE et coll., 1987a ; MARTONOSI 1984) est influencée par de nombreux facteurs : (1) le contenu calcique du réticulum sarcoplasmique. Un niveau minimum de charge en calcium du réticulum sarcoplasmique est indispensable pour observer une libération de la fibre pelée (ENDO et coll. 1970 ; FABIATO & FABIATO, 1972) ; (2) les concentrations externes en magnésium et en nucléotides adényliques. Il est reconnu que le magnésium inhibe la libération alors que les nucléotides adényliques l'activent ; (3) le type de vésicules employées. MIYAMOTO & RACKER, 1982 ; MEISSNER, 1984, ont rapporté que les préparations du réticulum sarcoplasmique enrichies en citernes terminales présentent une sensibilité nettement plus grande au calcium que celles enrichies en parties longitudinales.

I.4.1.2 Inositol 1-4-5-triphosphate.

L'inositol 1-4-5-triphosphate (InsP₃) est capable de libérer le calcium stocké à l'intérieur d'une grande variété de types cellulaires (BERRIDGE et IRVINE, 1984). Son rôle dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique a été souligné par plusieurs auteurs mais reste controversé (VOLPE et coll., 1987b). Si certains travaux réalisés sur fibre pelée et sur vésicule de réticulum sarcoplasmique isolée mettent en évidence un effet inducteur de

l'InsP3 pour la libération du calcium (VERGARA et coll. 1985 ; DONALDSON et coll. 1987), d'autres montrent son inefficacité sur de telles préparations (SCHERER et coll. 1985 ; LEA et coll. 1986).

I.4.1.3 Sodium.

Un mécanisme de libération du calcium réticulaire par une entrée de sodium via les canaux sodiques a pu être mis en évidence par POTREAU et RAYMOND (1982). En dehors de la constitution d'un potentiel d'action propagé, le courant sodique pourrait être directement responsable d'une partie de la contraction musculaire. Cependant l'importance de son rôle est encore mal précisé.

I.4.1.4 Théorie du voltage sensor.

Le "voltage sensor" est représenté par un complexe protéique sensible aux variations de potentiel du sarcolemme et dont le changement de conformation a pour effet de moduler la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique. Les observations ultrastructurales de BLOCK et coll. (1988), laissent fortement suggérer que le récepteur aux dihydropyridines (DHP) joue le rôle de voltage sensor dans le couplage excitation-contraction. Il fixe électivement les DHP antagonistes ou agonistes lors d'une dépolarisation membranaire et passe de l'état activé dans lequel la sortie du calcium réticulaire est induite à un état inactivé qui bloque la sortie de calcium réticulaire. Comme le canal calcique, il possède un site de liaison des ions calcium qui doit être occupé pour permettre son activation (BRUM et coll., 1988). Cependant, le transfert de l'information entre ce "sensor" et la libération du calcium du réticulum (couplage électromécanique ou électro-chimique par l'InsP3, le sodium, et / ou le calcium) n'est pas complètement élucidé.

Globalement, deux types de mécanismes peuvent être impliqués en fonction des besoins cellulaires. Lors d'une secousse musculaire déclenchée par un potentiel d'action, le déplacement du "voltage sensor" et l'entrée de sodium par les canaux sodiques activés peuvent être théoriquement impliqués compte tenu de leur cinétique respective compatible avec la vitesse

d'exécution. Pour des réponses contractiles de longue durée (tétanos, contracture induite par certains états pathologiques) le courant calcique lent via les canaux calciques de type L peut jouer un rôle de régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. De même l'InsP3 pourrait servir de second messenger. Enfin, les ions calcium directement fixés sur la membrane tubulaire pourraient jouer un rôle compte-tenu une nouvelle fois de la lenteur de leur cinétique d'action.

I.4.2 AGENTS PHARMACOLOGIQUES INDUCTEURS DE LA LIBERATION DU CALCIUM.

I.4.2.1 Halothane.

L'halothane exerce sur le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique un effet activateur de la libération du calcium. L'halothane libère le calcium en activant le mécanisme du "calcium-induced calcium release". Cependant selon SALVIATI (1991), l'halothane agirait avec d'autres modulateurs sur l'activité des canaux de relargage, en particulier avec la calmoduline dont l'activité serait déprimée.

I.4.2.2 Caféine.

La caféine augmente la sensibilité au calcium du mécanisme de "calcium-induced calcium release" dans les préparations de fibre pelée et les vésicules de réticulum sarcoplasmique isolées (ENDO et coll., 1977 ; KIRINO et coll., 1982 ; PALADE, 1987 ; SALVIATI et coll., 1988 ; ADNET et coll., 1993). En présence de caféine, une concentration de calcium faible ($3.10^{-7}M$) est capable d'induire une libération de calcium sur une fibre pelée de muscle squelettique. La caféine accélère aussi la vitesse de libération du calcium, mais à un degré moindre que celle provoquée par l'adénosine trisphosphate (ATP). Cependant, les effets de la caféine sont modulés par l'ATP, ce qui suggère que l'un et l'autre interviennent à différents niveaux des sites (NAGASAKI et coll., 1983). Selon NAGASAKI et coll. (1983), l'ATP n'affecterait pas le mécanisme du système de portes du canal calcique, mais augmenterait sa conductance.

I.4.2.3 Ryanodine.

L'effet de la ryanodine sur le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique suggère que la ryanodine active la libération du calcium (FAIRHURST et coll. 1970, 1973 ; MEISSNER, 1986). Il est plus prononcé que celui de la caféine dans l'augmentation de la perméabilité au calcium du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (MARTONOSI, 1984).

I.4.2.4 Anesthésiques locaux.

En plus de leurs actions inhibitrices des canaux sodiques et potassiques, les anesthésiques locaux sont connus pour affecter à différents niveaux le couplage excitation-contraction du muscle squelettique. Ainsi la procaine entre dans la catégorie des inhibiteurs du mécanisme du "calcium-induced calcium release" (THORENS et coll., 1975 ; ENDO, 1977 ; KIRINO et coll. 1982). La tétracaïne est reconnue pour être un inhibiteur de la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (OHNISHI, 1979) et elle s'oppose à la contracture musculaire de fibre induite par la caféine ou par la dépolarisation (THORENS et coll., 1975).

I.4.2.5 Dantrolène.

Le dantrolène sodique (1-[5(p-nitophényl)-furfurilidene-amino]-hydantoin sodium hydrate) est un relaxant musculaire utilisé dans le traitement de l'hyperthermie maligne et du spasme. Il déprime le couplage excitation-contraction du muscle squelettique sans interférer sur la transmission neuromusculaire et sur la conduction du potentiel d'action (DESMET et coll. 1979 ; ELLIS et coll. 1972 ; PUTNEY et coll. 1974). Plusieurs auteurs ont montré que le dantrolène diminue le calcium libre cytoplasmique et l'efflux calcique sans avoir un effet sur l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (DESMET et coll. 1977 ; SENGUTA et coll. 1980 ; CAMPBELL et coll. 1980). Le dantrolène réduit également la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique et l'amplitude de la tension isométrique sans affecter le recaptage du calcium pendant la relaxation (DESMEDT et coll. 1977).

CHAPITRE II

L'HYPERTHERMIE MALIGNNE

II.1 DESCRIPTION.

II.1.1 HISTORIQUE.

L'hyperthermie maligne est une dysrégulation métabolique aigüe des muscles striés, chez des sujets génétiquement déterminés, porteurs d'une myopathie infraclinique induite par des agents anesthésiques halogénés. Le caractère héréditaire de la sensibilité à l'hyperthermie maligne a été décrit par DENBOROUGH en 1960. Il a fallu attendre les travaux de BRISKEY (1964) et HALL (1966) pour identifier la crise de l'hyperthermie maligne chez le porc et effectuer le rapprochement avec l'homme. Ce n'est qu'un peu plus tard en 1971 que fut proposé le test de contracture *in vitro* pour le dépistage de l'hyperthermie maligne par KALOW (1970) et ELLIS (1971) : des segments musculaires prélevés par biopsie chirurgicale des sujets sensibles à l'hyperthermie maligne présentent une hypersensibilité à la caféine et une contracture anormale à l'halothane. Deux étapes ont marqué l'évolution des connaissances de l'hyperthermie maligne : (1) le dantrolène a été proposé comme l'agent thérapeutique des crises par HARRISON (1975) chez le porc et par KOLB (1982) chez l'homme ; (2) la localisation de l'anomalie génétique sur un ou plusieurs loci codant le récepteur à la ryanodine situé sur le RS du muscle squelettique (Mc CARTHY et coll. 1990 ; Mac LENNAN et coll. 1991). En effet dans les années 1990, les travaux de deux équipes ont permis de localiser puis de caractériser le gène de l'hyperthermie maligne. L'équipe de Mc CARTHY a montré un lien étroit entre la transmission de l'hyperthermie maligne et les marqueurs du gène GPI (glucose phosphate isomerase) situé sur le chromosome 19 dans la région q12-13, 2. Dans le même temps MacLENNAN a localisé le gène RYR1 dans la région q13, 1 sur le chromosome 19. Ce gène, qui code pour les protéines qui fixent la ryanodine, est présent exclusivement dans le muscle squelettique. Ces protéines sont l'infrastructure du récepteur à la ryanodine. Dans le muscle HM, une anomalie fonctionnelle du canal calcique réticulaire et/ou du récepteur à la ryanodine serait le principal responsable d'une augmentation considérable du taux de calcium libre intramyoplasmique. Cette surcharge calcique intramyoplasmique initie et perpétue l'ensemble des réactions métaboliques conduisant à la contracture musculaire avec production de chaleur (NELSON 1983 ; KIM et coll. 1984 ; O'BRIEN 1990).

La seule méthode de diagnostic suffisamment spécifique et sensible est la réalisation de tests réalisés *in vitro* sur des segments musculaires prélevés chirurgicalement et exposés à l'halothane ou à la caféine (EUROPEAN MALIGNANT HYPERTHERMIA GROUP, 1984 ; NORTH AMERICAIN MALIGNANT HYPERTHERMIA GROUP, 1989). Un segment musculaire d'un patient sensible à l'HM (HMS) présente une contracture anormale en présence d'halothane (ELLIS, 1971) et un seuil de contracture caféinique plus bas que celui d'un patient non sensible (HMN) (BRITT et coll. 1973). Si une hypersensibilité directe à la caféine du réticulum sarcoplasmique du muscle sensible à l'hyperthermie maligne (O'BRIEN 1990) est bien établie aujourd'hui, l'accord en ce qui concerne le mécanisme d'action de l'halothane est loin d'être unanime. En fait, de nombreuses hypothèses peuvent être proposées à partir des connaissances actuelles des systèmes membranaires et des protéines cellulaires qui interviennent dans la régulation calcique intracellulaire.

II.1.2 DIAGNOSTIC DE LA SENSIBILITE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE.

L'investigation directe du muscle squelettique prélevé par biopsie chirurgicale et soumis à des concentrations croissantes d'halothane d'une part, et de caféine d'autre part, constitue la méthode la plus fiable pour diagnostiquer l'HM. La biopsie musculaire est pratiquée au niveau du muscle vaste interne ou externe chez des sujets ayant subi une crise HM et chez les membres consanguins de la famille. Ces tests de contracture à l'halothane et à la caféine ont été standardisés en Europe et aux Etats-Unis (EUROPEAN MALIGNANT HYPERTHERMIA GROUP, 1984 ; NORTH AMERICAIN MALIGNANT HYPERTHERMIA GROUP, 1989).

II.1.2.1 Protocole européen.

Le diagnostic *in vitro* est établi à partir des résultats obtenus sur deux tests statiques à l'halothane réalisés (selon des méthodes pharmacologiques du couplage excitation-contraction) sur deux lambeaux musculaires séparés et deux tests statiques à la caféine réalisés sur deux autres lambeaux. Un test est considéré comme positif lorsque le lambeau musculaire développe une contracture égale ou supérieure à 0.2 gf pour des concentrations d'halothane inférieures ou égales à 2 vol % d'halothane et pour des concentrations de caféine inférieures ou égales à 2 mM.

Ces résultats amènent à classer les sujets en trois groupes diagnostiques (figure 5) :

- sensible (HMS) : les tests à la caféine et à l'halothane sont positifs.
- non sensible (HMN) : les tests à la caféine et à l'halothane sont négatifs.
- équivoque (HME) : seul un test est positif.

II.1.2.2 Protocole américain.

Un lambeau musculaire est exposé d'emblée à 3 vol % d'halothane pendant 10 min. Le test est considéré comme positif lorsque le lambeau développe une contracture supérieure à 0.5 gf. Un exemple de tracé illustrant les contractures du muscle HM induites par l'exposition à l'halothane est donné dans les figures 6 et 7.

II.1.2.3 Autres tests.

De nombreux tests ont été proposés (pour revue ORDING, 1988 ; KRIVOSIC-HORBER et ADNET, 1989). Ils peuvent être classés en : (1) tests électrophysiologiques (stimulation du motoneurone, pendant une ischémie provoquée ; électromyogramme sur fibre unique) ; (2) tests sur prélèvements sanguins (taux de créatine phosphokinase, dosage des cholinestérases plasmatiques, tests plaquettaires, tests érythrocytaires comme la chémoluminescence, la spectroscopie en résonance magnétique nucléaire électronique, l'utilisation du marqueur leucocytaire antigénique de type HLA) ; (3) tests biochimiques (mesure du calcium libre intramyoplasmique, du taux d'AMPcyclique et activité adénylcyclase, de la déplétion musculaire en ATP après exposition à l'halothane, du recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique, de la spectroscopie en résonance magnétique nucléaire au ^{31}P). Cependant les résultats apportés à ce jour ne sont pas assez convaincants pour remplacer les tests pharmacologiques.

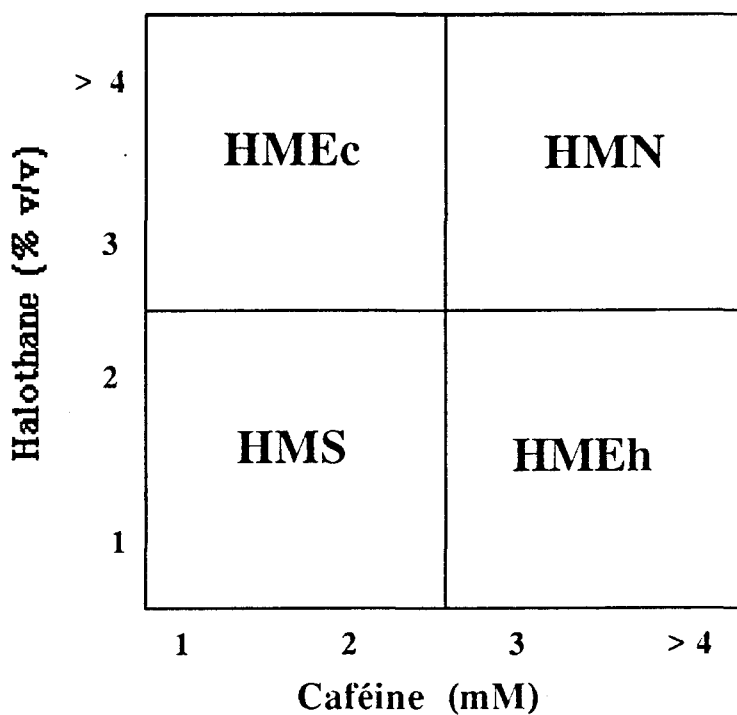


FIGURE 5 :

Distribution des résultats des tests de dépistage de l'hyperthermie maligne

(D'après le Groupe Européen d'Hyperthermie maligne, 1984)

(HMS) sensibles à l'hyperthermie maligne : tests caféine et halothane positifs ; (HMN) non sensibles à l'hyperthermie maligne : caféine et halothane négatifs ; (HME) équivoques : un des deux tests est positif.

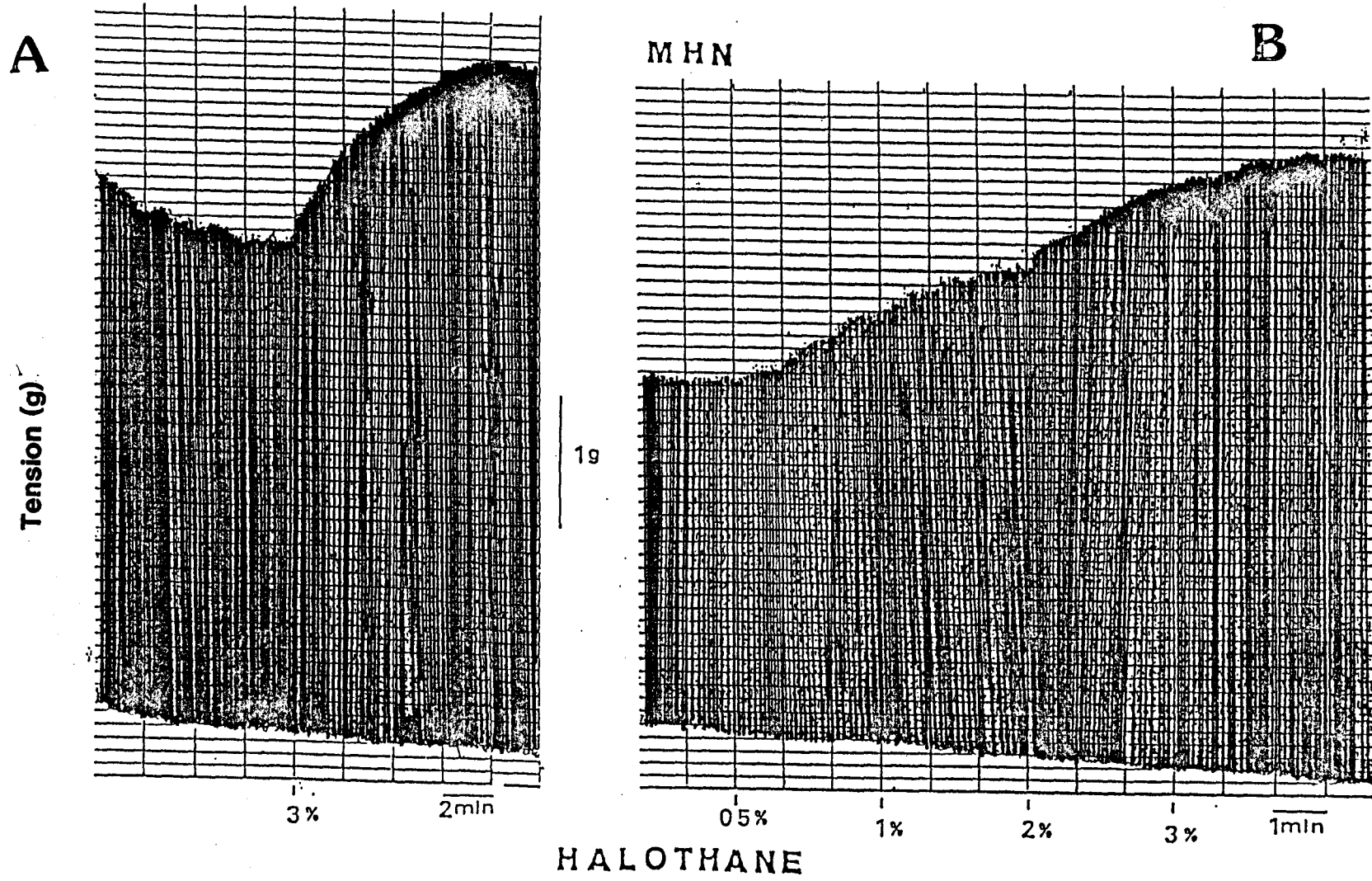


Figure 6 : Exposition du muscle normal à 3% vol d'halothane (A) et à des concentrations croissantes d'halothane (B).

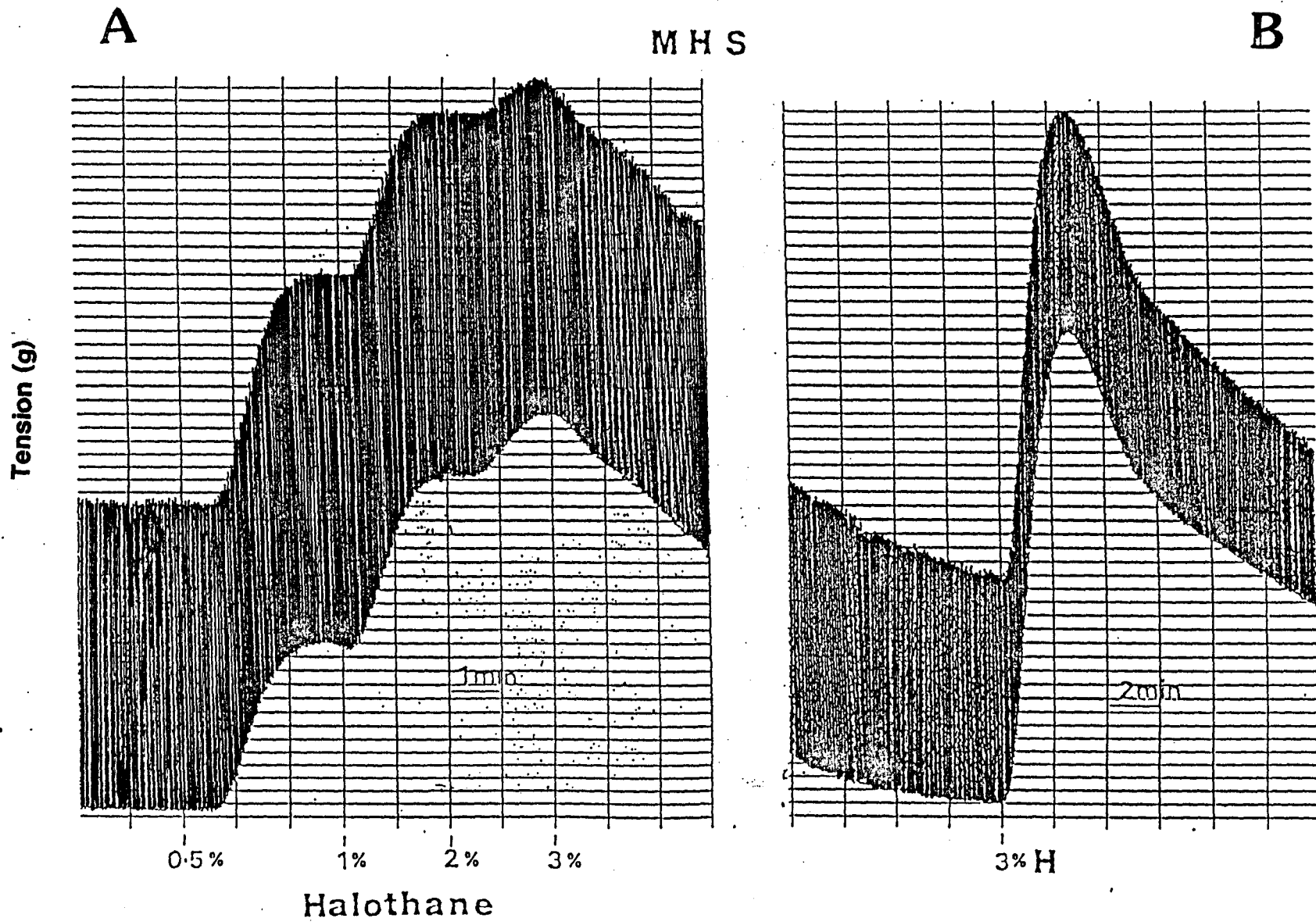


Figure 7 : Exposition du muscle sensible à l'HM à des concentrations croissantes d'halothane (A) et à 3% vol d'halothane (B).

II.2 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPERTHERMIE MALIGNE.

II.2.1 AU NIVEAU CELLULAIRE.

II.2.1.1 Sarcolemme.

Plusieurs auteurs (NELSON et CHAUSMAN 1981 ; LOPEZ et coll. 1985) ont respectivement montré une augmentation intracytoplasmique du calcium libre dans le muscle squelettique chez l'homme atteint de l'hyperthermie maligne et chez le porc. MAC INTOSH et BERMAN (1973) ont trouvé chez le porc sensible à l'hyperthermie maligne que les phospholipides du sarcolemme contenaient moins d'acides gras saturés chez le porc non sensible, et que ce déficit en acides gras saturés serait à l'origine d'une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions calcium. Des travaux réalisés à partir de vésicules isolées purifiées de sarcolemme de porc sensible à l'hyperthermie maligne ont montré une diminution anormale de l'accumulation du calcium dans ces vésicules, ce qui correspond sur une cellule entière à une sortie de calcium dans l'espace extracellulaire (MICKELSON et coll. 1987). Ces travaux mettent en évidence une altération au niveau de la sortie de calcium qui contribuerait à l'augmentation de la concentration en calcium dans le myoplasme. En outre, WIELLAND et coll. (1989) démontrent une élévation de la perméabilité membranaire aux ions sodium à l'aide de technique de voltage-clamp.

II.2.1.2 Réticulum sarcoplasmique.

Depuis plus d'une décennie, le réticulum sarcoplasmique a été le centre de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* souvent contradictoires. Le réticulum sarcoplasmique a deux rôles essentiels : (1) relarguer une grande quantité de calcium pour induire la contraction ; (2) dans un deuxième temps, repomper activement le calcium pour permettre la relaxation. A partir d'études réalisées sur des préparations de fibres pelées, il a été retrouvé une altération de la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique chez les sujets sensibles à l'hyperthermie maligne. Aussi bien chez l'homme HMS que chez les porcs sensibles à l'hyperthermie maligne, les études sur fibres pelées ont montré une augmentation de la libération du calcium induite par le calcium, mais aussi une hypersensibilité de cette libération de calcium sous l'influence de l'halothane et de la caféine (TAKAGI, 1976 ; ENDO et coll. 1983 ; SALVATI et coll. 1990 ; ADNET et coll.

1993). Parallèlement certains auteurs, en utilisant des indicateurs calciques tels que l'arsenazo III ou la calcéïne, ont montré sur des préparations de vésicules de réticulum sarcoplasmique isolées, un dérèglement au niveau de la libération du calcium (NELSON 1983 ; OHNISHI et coll. 1983, 1987). Par ailleurs MICKELSON (1986, 1988) et KIM et ses collaborateurs (1984, 1986, 1988) ont montré avec du calcium marqué que la vitesse de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique est beaucoup plus rapide chez le porc sensible à l'hyperthermie maligne que chez le porc non sensible. En résumé, les résultats expérimentaux convergent pour indiquer une altération de la libération du calcium hors du réticulum sarcoplasmique chez les sujets sensibles à l'hyperthermie maligne.

La littérature fait état de résultats contradictoires en ce qui concerne la relaxation. La relaxation est un phénomène actif. La pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique permet le recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Cette pompe fonctionne contre un gradient de concentration et nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP pour l'entrée de deux moles de calcium. Chez les sujets sensibles à l'hyperthermie maligne CONDRESCU et coll. (1987), ont trouvé chez l'homme une nette diminution de l'accumulation du calcium comparée à celle relevée chez les sujets non sensibles. En revanche, certains auteurs n'ont trouvé aucune modification par l'halothane du recaptage du calcium ou de la sensibilité au calcium des protéines contractiles quelque soit le type de fibres de sujets sensibles ou non sensibles à l'HM (OHNISHI 1983 ; KIM 1984 ; MICKELSON 1986 ; OTHA et coll. 1989). En outre pour NELSON (1987), l'accumulation du calcium dans le réticulum sarcoplasmique ne semble pas être l'anomalie en cause dans l'hyperthermie maligne.

II.2.1.3 Mitochondrie.

S'il est clairement établi que les mitochondries sont le siège de la respiration cellulaire et des réservoirs de stockage du calcium à long terme, son rôle dans l'hyperthermie maligne est encore mal compris. La capacité d'accumulation de la mitochondrie excède largement celle des autres structures cellulaires (DENTRON et coll. 1980 ; HANSFORD et coll. 1981) et lui confère un rôle fondamental dans les différentes conditions physiologiques et pathologiques (par exemple, l'insuffisance cardiaque, l'infection ou le traumatisme chirurgical) en empêchant ou en

retardant une augmentation massive du calcium cytoplasmique après que tous les mécanismes régulateurs calciques aient été débordés.

II.2.1.4 Type de fibres (lentes ou rapides).

Certains auteurs ont montré *in vitro* chez l'animal (DEUSTER et coll. 1985 ; SHAH et coll. 1988) et puis plus récemment chez l'homme (ADNET et coll. 1993) que les fibres lentes (type I) présentent un seuil de sensibilité à la caféine plus bas que les fibres rapides (type II) dans l'induction de la contracture. Les fibres de sujets sensibles à l'HM ont un seuil de réactivité à la caféine plus bas que les fibres de sujets non sensibles. Aucune différence n'est mise en évidence entre les seuils de contracture des fibres de type I et II chez les sujets sensibles à l'HM et l'ensemble de ces données suggère une atteinte préférentielle des fibres de type II dans l'HM.

II.2.2 AU NIVEAU DE L'ORGANISME ENTIER.

A côté de l'hyperthermie qui peut atteindre 42 °C, on observe une stimulation intense du système sympathique qui se traduit par une tachycardie parfois très précoce, des arythmies ventriculaires, une vasoconstriction périphérique et une instabilité tensionnelle. D'autres signes cliniques sont également observés (rigidité musculaire) et les principaux signes biologiques sont : l'acidose ($\text{pH} \leq 6.8$), l'hyperkaliémie ($\text{K} \geq 5 \text{ meq/l}$), une rhabdomyolyse (supérieure à 10.000 UI/l).

II.3 EFFETS PHARMACOLOGIQUES DE L'HALOTHANE

II.3.1 SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE NON SENSIBLE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE .

L'halothane exerce un effet inotrope positif sur le muscle squelettique (WILLIAM et coll. 1991 ; ETCHRIVI et coll. 1994) qui est la résultante de son influence à tous les niveaux du couplage excitation-contraction. De récents travaux ont permis d'étudier par des techniques électrophysiologiques l'effet de l'halothane sur des préparations de muscles squelettiques. L'halothane n'a pas d'effet sur le potentiel de repos membranaire (IAZZO et coll. 1989), mais

diminue l'amplitude du potentiel d'action ainsi que le courant entrant sodique dépolarisant (I_{Na}) qui pourrait, selon ces auteurs, perturber le déroulement normal du couplage excitation-contraction.

L'utilisation de la technique des fibres pelées permet d'étudier l'effet de l'halothane sur les capacités de recaptage et de libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique. De travaux récents menés sur des fibres animales (OHTA et coll., 1989) montrent que l'halothane augmente la capacité du réticulum à libérer du calcium de manière dose-dépendante. Les mêmes observations avaient été faites sur des préparations de vésicules isolées du réticulum sarcoplasmique provenant de muscles squelettiques de rat, de lapin, de grenouille et de porc (OHNISHI 1979 ; OGAWA 1982a, 1982b ; BEELER et coll., 1985; CARRIER et coll., 1990 ; RICARDO et coll., 1994). Il semble que l'halothane active les canaux calciques en augmentant la durée d'ouverture des portes sans modifier l'amplitude du courant, cet effet étant modulé par plusieurs substances comme le calcium cytosolique, l'ATP, le magnésium et le rouge ruthénium (RICARDO et coll. 1994).

II.3.2 SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE SENSIBLE A L'HYPERTHERMIE MALIGNE .

Il est établi que les récepteurs aux 1-4 dihydropyridines (DHP) représentent une structure clé dans le mécanisme du couplage excitation-contraction. Sur le muscle squelettique normal, les récepteurs aux DHP régulent la libération du calcium à partir du canal calcique réticulaire (RIOS et coll. 1987 ; MEISSNER 1986 ; LAMB et coll. 1988). La présence des antagonistes (nifédipine, vérapamil et diltiazem) ou des agonistes (Bay K 8644) inhibent ou activent respectivement la libération du calcium libre intramyoplasmique. Sur le muscle squelettique sensible à l'HM, l'utilisation des dihydropyridines associés ou non à l'halothane a mis en évidence une dysrégulation de la libération du calcium libre intramyoplasmique (ADNET et coll. 1991 ; NELSON 1992). Ainsi dans la pathologie de l'HM, toute modulation pharmacologique des récepteurs DHP permet d'augmenter ou d'atténuer la contracture musculaire induite par l'halothane. Plusieurs auteurs ont montré l'implication des récepteurs à la ryanodine dans l'HM (LAI et coll. 1988 ; Mac LENNAN et coll. 1990). En effet, la ryanodine à une concentration

supérieure à 10^{-7} M seule ou associée à l'halothane induit une contracture sur le muscle HM (LAI et coll. 1988 ; Mac LENNAN et coll. 1990 ; NELSON 1990).

Au total, on peut dire que toute substance qui module la cinétique calcique augmente ou diminue la contracture musculaire induite par l'halothane. En l'état actuel des connaissances, seul le dantrolène sodique agit directement sur le ou les mécanisme(s) de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique en abaissant le taux intracellulaire de calcium (SNYDER 1967 ; OHNISHI et coll. 1986 ; LOPEZ et coll. 1987 ; OHTA et coll. 1989).

Le muscle squelettique reste la cible privilégiée de l'HM lors du déclenchement de la crise, notamment par la manifestation de la rigidité musculaire qui serait la conséquence d'une absence de relaxation et / ou d'une forte contracture. La surcharge calcique intramyoplasmique résulte d'un déséquilibre des structures qui régulent la libération et le repompage du calcium dans le RS. Deux éléments cellulaires déterminent la relaxation musculaire : (1) le réticulum sarcoplasmique par l'intermédiaire de la pompe Ca-ATPase assure le recaptage du calcium ; (2) les myofilaments par leur sensibilité au calcium modifient le relâchement musculaire. Le développement de la contracture est l'expression phénotypique de l'anomalie génétique du muscle sensible à l'HM. Nous pensons qu'une modification caractéristique des phases de contraction et de relaxation pourrait accompagner le développement de la contracture. Notre objectif est d'établir un lien entre la contracture et les paramètres mécaniques du muscle sensible à l'HM. Une analyse des propriétés intrinsèques du muscle squelettique sensible à l'HM est indispensable afin de préciser le mécanisme d'action de l'halothane. Nous avons utilisé deux produits pharmacologiques, l'acide cyclopiazonique (inhibiteur spécifique de la pompe Ca^{2+} -ATPase) et la vératrine (agoniste sodique).

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

III.1 PRELEVEMENTS ET PREPARATIONS POUR LES ETUDES REALISEES SUR DES LAMBEAUX MUSCULAIRES.

III.1.1 PRELEVEMENTS ET PREPARATIONS

L'ensemble des travaux a été réalisé chez des patients ayant survécu à un épisode évocateur d'hyperthermie maligne (HM) ou chez des membres consanguins de leurs famille testés pour le diagnostic de la sensibilité HM. Les biopsies musculaires réalisées chez les patients diagnostiqués suivant le protocole HM standardisé ont été incluses, après accord du Comité d'Ethique du C.H.&U. de Lille. La biopsie musculaire est réalisée chirurgicalement au niveau du muscle vaste externe sous anesthésie loco-régional du nerf fémoro-cutané et du nerf crural. Le prélèvement est immédiatement transporté au laboratoire dans la solution de Krebs-Ringer dont la composition (mM) est la suivante : NaCl 118,1 ; KCl 3,4 ; MgSO₄ 0,8 ; KH₂PO₄ 1,2 ; NaHCO₃ 25 ; CaCl₂ 2,5 ; Glucose 11.

Chaque lambeau musculaire isolé (20 mm x 1 mm) est ligaturé à chaque extrémité, puis immergé dans une cuve d'un volume de 5 ml, alimentée à débit constant (4 ml/min) par une solution de Krebs-Ringer, oxygénée par un mélange gazeux contenant 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂, thermorégulée à 37°C, à pH 7,4.

L'une des extrémités du fragment musculaire est épinglée sur le fond recouvert de silicone de la cuve expérimentale (volume de 5ml), l'autre est reliée à un transducteur isométrique (Palmer type UF1), couplé après amplification à un enregistreur papier (LINSE IS 7020). La contraction musculaire est visualisée sur un oscilloscope numérique (GOULD 1602). Le muscle est stimulé par un champ électrique grâce à deux électrodes délivrant des impulsions rectangulaires de 2 ms de durée et d'intensité légèrement supérieure à l'intensité seuil, avec une fréquence de stimulation de 0,2 Hz. L'étude s'effectue sur un muscle initialement préchargé à L_{max}, qui est la longueur correspondant à l'apex de la courbe de Starling longueur - tension active. Le muscle ne peut être étiré au delà de cette longueur initiale grâce à la mise en place d'un système électronique.

III.1.2 CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA SENSIBILITE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE.

Les tests de contracture ont été standardisés en Europe et en Amérique du Nord. Un fragment musculaire est soumis à des concentrations croissantes de 0,5 à 3 vol % d'halothane introduit dans le circuit d'oxygénation par un vaporisateur (Fluotec-Mark III). Un autre fragment musculaire est exposé à des concentrations croissantes et cumulées de caféine (Prolabo) (0,5 à 32 mM) préalablement dissoute dans la solution de Krebs-Ringer. Le résultat de chaque test est considéré comme positif lorsque le lambeau musculaire développe une contracture supérieure ou égale à 0,2 gf pour des concentrations d'halothane inférieure ou égale à 2 vol % et/ou des concentrations de caféine inférieure ou égale à 2 mM. Selon le protocole américain, un fragment musculaire est exposé d'emblée à 3 vol % d'halothane pendant 10 min. Le test est considéré comme positif si le lambeau développe une contracture supérieure ou égale à 0,5 gf. Les critères diagnostiques permettent de classer les patients en trois groupes selon les résultats obtenus : (1) sensibles ou HMS lorsque les tests à la caféine et à l'halothane sont positifs ; (2) non sensibles ou HMN lorsque les tests à la caféine et à l'halothane sont négatifs ; (3) équivoques ou HME lorsque l'un des deux tests est positif (figure 5). Cependant dans notre étude les sujets équivoques ne sont pas pris en compte étant donné qu'à l'heure actuelle la signification de ce résultat n'est pas connue.

III.1.3 INDICES MECANQUES DU COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION

Différents paramètres mécaniques du cycle contractile ont permis de caractériser la phase de contraction (figure 8) : tension développée normalisée en fonction de la section du muscle (PT) (mN/cm^2) ; temps nécessaire pour atteindre le pic de force isométrique (TPT) (ms) ; pic positif de la dérivée de la tension isométrique normalisée par la section ($+ \text{dP}/\text{dtmax}/\text{cm}^2$) ($\text{mN}/\text{s}/\text{cm}^2$). Pendant la phase de relaxation : pic négatif de la dérivée de la tension isométrique à L_{max} normalisé par la section ($- \text{dP}/\text{dtmax}/\text{cm}^2$) ($\text{mN}/\text{s}/\text{cm}^2$) ; temps de demi-relaxation ($\text{RT}_{1/2}$) (ms). On définit l'effet lusitrope positif comme une augmentation de $- \text{dP}/\text{dtmax}/\text{cm}^2$ et

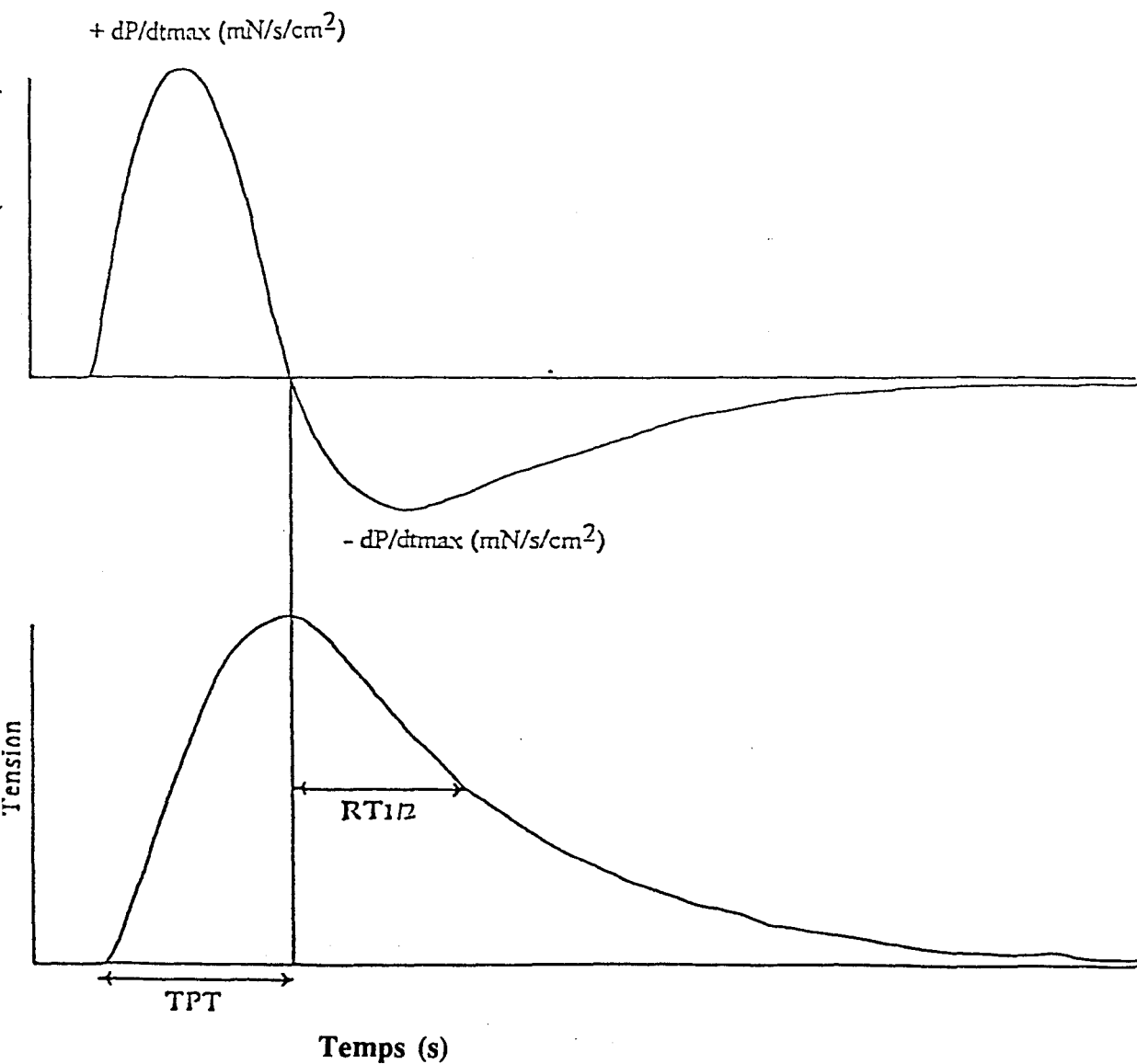


Figure 8 : Représentation des différents paramètres mécaniques utilisés pour caractériser les phases de contraction et de relaxation. TPT, temps nécessaire pour atteindre le pic de force isométrique; RT1/2, temps de demi-relaxation; $+dP/dt_{max}$ et $-dP/dt_{max}$ sont les pics positifs et négatifs de la dérivée de la tension isométrique; $R=(+dP/-dP)$ teste le couplage contraction-relaxation.

un effet lusitrope négatif comme une diminution de $-dP/dt_{max}/cm^2$ (KATZ et coll., 1990). Le rapport $R = (+dP/dt_{max}) / (-dP/dt_{max})$ teste le couplage contraction-relaxation en isométrie. Une augmentation de R témoigne d'un effet relaxant négatif et inversement, une diminution de R atteste d'un effet relaxant positif (CHEMLA et coll. 1986 ; LECARPENTIER et coll. 1987).

Ces différents paramètres ont été mesurés en présence de concentrations croissantes d'halothane (0 - 3 vol % d'halothane) après 3 minutes d'exposition à chaque concentration ou au plateau de contracture. Dans le cas de l'étude des effets d'une substance (vératrine ou acide cyclopiazonique), les paramètres sont mesurés avant et après la période d'incubation selon le même protocole.

L'étude de l'effet d'une substance pharmacologique (vératrine et acide cyclopiazonique) sur la contractilité du muscle, a été réalisée par addition du produit mis en solution dans son solvant et dilué à la concentration souhaitée dans la solution de Krebs-Ringer. La vératrine et l'acide cyclopiazonique ont été dilués respectivement dans l'éthanol et dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO). Des études préliminaires ont montré que les solvants aux concentrations finales (1/1000) n'avaient aucun effet sur les phases de contraction et de relaxation du muscle. La durée d'incubation des lambeaux musculaires dans les substances pharmacologiques est de 15 minutes. Après cette période d'incubation, les lambeaux musculaires sont exposés aux concentrations croissantes d'halothane.

III.2 TECHNIQUE DE LA FIBRE PELEE

III.2.1 DEFINITIONS ET GENERALITES

La technique consiste à rendre perméable la membrane sarcolemmique d'une fibre musculaire afin d'accéder au compartiment intracellulaire. La fibre pelée permet d'étudier les propriétés fonctionnelles du réticulum sarcoplasmique, en particulier sa capacité de relargage et de recaptage du calcium en présence ou non d'un effecteur (figure 9). L'utilisation d'un détergent "Brij" ou encore le triton (X-100) rend le réticulum non fonctionnel, détruit les mitochondries et permet d'étudier exclusivement le fonctionnement des protéines contractiles. Les myofibrilles

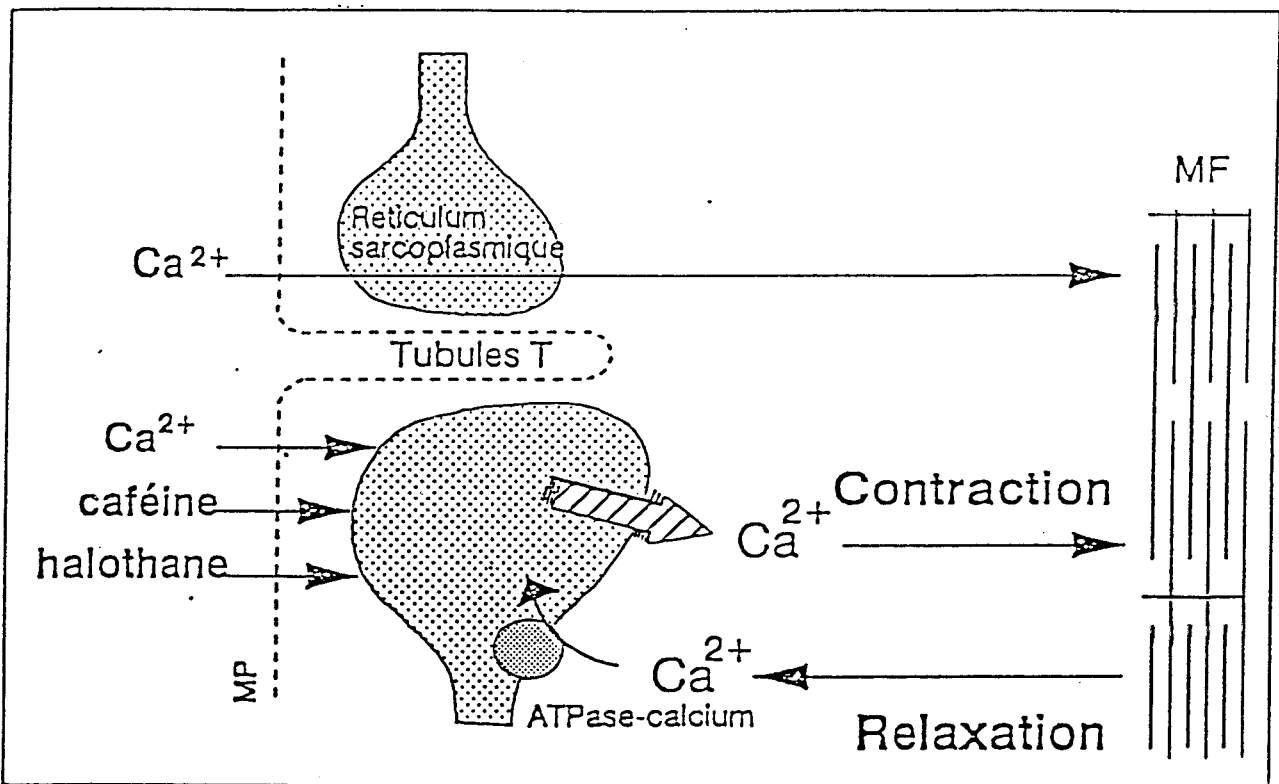


FIGURE 9 : Représentation schématique d'une fibre musculaire dont la membrane externe a été pelée. (MP) : membrane plasmique; (MF) myofilaments. Les structures internes (reticulum sarcoplasmique et myofilaments) sont accessibles aux substances ajoutées au milieu externe.

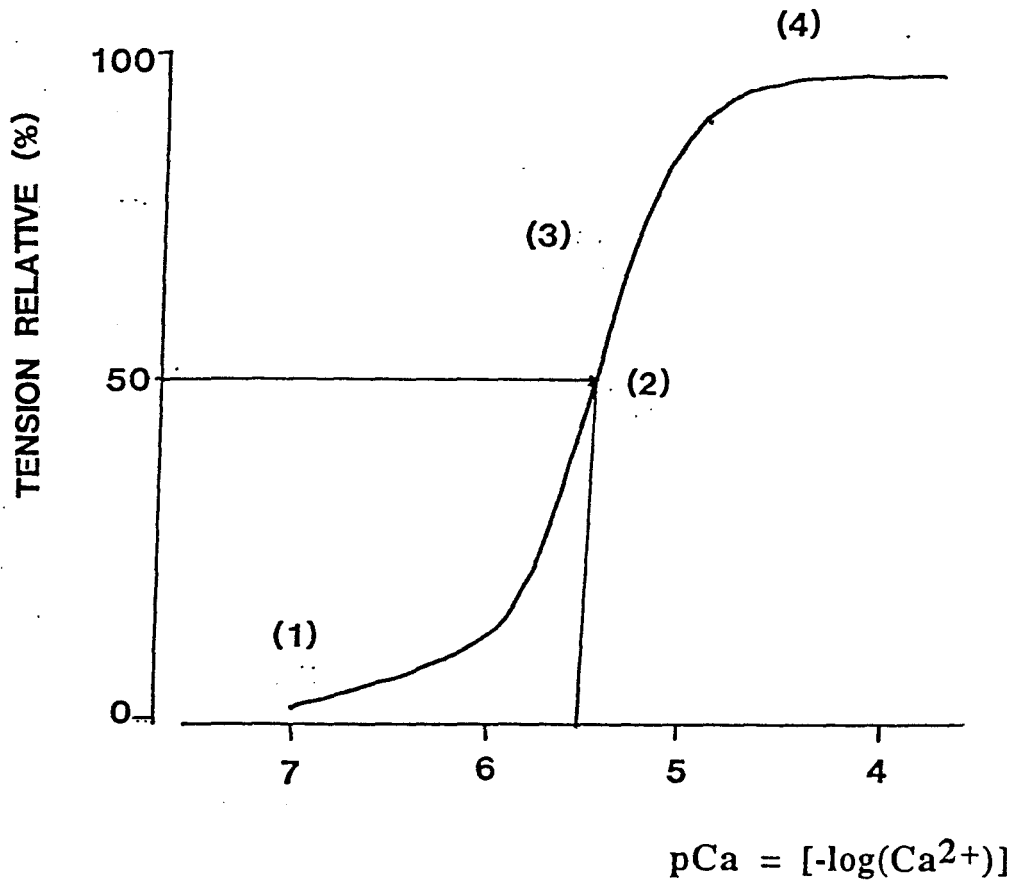
demeurent structurées aussi bien dans les préparations multicellulaires (par exemple le coeur) ou monocellulaires (c'est le cas de la fibre pelée squelettique), ce qui permet d'analyser la contractilité. Ainsi la tension de repos et la tension maximale représentent les propriétés contractiles intrinsèques de ces préparations. La tension développée dépend de la quantité de calcium libre disponible pour l'activation des myofilaments, elle-même déterminée par l'affinité de la Troponine-C (TN-C) pour le calcium (KERRICK et coll. 1980).

La relation entre la pCa [$-\log(\text{Ca})$] et la tension développée est une relation sigmoïde, régie par l'équation de Hill (figure 10) : où P est la tension exprimée en pourcentage de la tension maximale ; $[\text{Ca}^{2+}]$ est la concentration en calcium de la solution ; N_h représente le coefficient de Hill ; K_d est la constante de dissociation apparente (KERRICK et coll. 1976). Cette relation permet d'accéder aux caractéristiques fonctionnelles de la fibre : (1) le seuil d'activation qui traduit le seuil de sensibilité au calcium ; (2) la valeur de la pCa qui induit le développement d'une tension égale à 50 % de la tension maximale (pCa 50) définie la sensibilité au calcium des myofilaments ; (3) le coefficient de Hill qui correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe. Un déplacement de la relation tension - pCa vers la droite représente une diminution de la sensibilité au calcium de la contraction. Un déplacement de la courbe vers la gauche traduit une augmentation de la sensibilité.

III.2.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.

III.2.2.1 Préparation et montage des fibres pelées.

Lors de la biopsie chirurgicale, un segment de muscle composé d'une centaine de fibres musculaires est fixé sur un bâtonnet de balsa puis délicatement prélevé et immédiatement plongé dans une solution de pelage. Nous avons utilisé une méthode de pelage proche de celle décrite par WOOD et coll., 1975. Les fibres, préalablement fixées sur un support de bois, sont pelées par l'acide éthylène glycol-bis (B-aminoéthyl éther) N, N, N', N'-tétra-acétique (EGTA), chélateur du calcium, qui perméabilise la membrane du sarcolemme sans altérer celle du réticulum sarcoplasmique (WOOD et coll. 1975). Les fibres sont plongées dans ce milieu dénommé solution de relax à 4 °C pendant 24 heures puis conservées à - 20 °C dans une solution de



(1) = Seuil d'activation

(2) = pCa 50 : sensibilité des protéines contractiles au calcium

(3) = nh : pente de la partie rectiligne de la courbe (coefficient de Hill)

(4) = valeur de la tension maximale développée

$$\text{Equation de Hill : } P = \frac{[(Ca^{2+})/Kd]^{nh}}{1 + [(Ca^{2+})/Kd]^{nh}}$$

Figure 10 : Représentation schématique d'une courbe Tension - pCa obtenue à partir de l'équation de Hill

conservation contenant du glycérol. La composition des différentes solutions est donnée dans le tableau 2.

Au moment de son utilisation, une fibre musculaire est isolée à l'aide de deux pinces fines sous loupe binoculaire (x 25) dans la solution de relax. Cette fibre est ensuite placée à la température ambiante (20 ± 1 °C) dans une cuve expérimentale (1ml) où elle est fixée aux extrémités par deux pinces, l'une étant solidaire de la cuve, l'autre étant reliée à un transducteur de tension isométrique (Grass force-displacement transducer ; FTO3). La réponse est amplifiée (Tektronix AM 502 differential amplifier) puis enregistrée sur papier (Gould recorder 2200 S). Les solutions sont rapidement évacuées de la cuve par un système d'aspiration sous vide. La longueur et le diamètre de la fibre sont mesurés à l'aide d'un oculaire micrométrique adapté sur un microscope inversé (Zeiss ID O2) (x 160). L'aspect de la fibre est vérifié. Seules les fibres présentant des contours réguliers et des striations parallèles sont retenues. La fibre est étirée de 20 % de sa longueur de repos par déplacement axial de la pince solidaire de la cuve. Cet étirement est calculé à l'aide de l'oculaire micrométrique et correspond à une distance entre deux sarcomères de 2.9 à 3.1 μm , ces valeurs étant en accord avec celles déterminées par WOOD et coll. (1975 ; 1978). Cet étirement correspond à la tension active optimale développée par la fibre.

Les fibres sont différenciées en type I (fibres lentes à prédominance oxydative) et type II (fibres rapides à prédominance glycolytique) suivant leur réactivité au strontium. Cette méthode de typage a été précédemment décrite par KERRICK et coll. (1976), SALVIATI et coll. (1982), TAKAGI et coll. (1983) et validée au laboratoire (ADNET et coll., 1993). Pour chacune des fibres pelées, nous avons réalisé une courbe effet-concentration de strontium. La concentration de strontium permettant d'atteindre 50 % de la tension maximale est appelée pSr 50. Les fibres ayant une pSr 50 supérieure à 5.4 sont typées I, celles ayant une pSr 50 inférieure à 5.4 sont typées II. Il ne semble pas possible, par cette méthode, de différencier les fibres IIa des fibres IIb.

III.2.2.2 Les solutions utilisées.

Tous les produits entrant dans la composition des solutions proviennent de Sigma Chemical sauf la caféine (Prolabo) et l'halothane (Belamont). Les concentrations des composants

Tableau 2 : Composition des solutions (mM/l)

SOLUTION	K-PROPIONATE	Mg-ACETATE	K2-EGTA	MOPS	Ca-EGTA	Sr-EGTA
Solution Relaxante	170	2,5	5	10		
Solution Wash	185	2,5	0	10		
Solutions de Calcium						
pCa 6,8 = $1,6 \times 10^{-4}$	172	2,46	3,85	10	1,152	
pCa 6,4 = $4,0 \times 10^{-4}$	172	2,44	2,85	10	2,159	
pCa 6,2 = $6,3 \times 10^{-4}$	172	2,44	2,28	10	2,720	
pCa 6,0 = $1,0 \times 10^{-3}$	172	2,42	1,73	10	3,272	
pCa 5,8 = $1,6 \times 10^{-3}$	172	2,42	1,25	10	3,752	
pCa 5,6 = $2,5 \times 10^{-3}$	172	2,40	0,86	10	4,144	
pCa 5,4 = $4,0 \times 10^{-3}$	172	2,40	0,57	10	4,432	
pCa 5,2 = $6,3 \times 10^{-3}$	172	2,40	0,36	10	4,640	
pCa 5,0 = $1,0 \times 10^{-2}$	172	2,40	0,22	10	4,784	
pCa 4,8 = $1,6 \times 10^{-2}$	172	2,40	0,11	10	4,888	
Solutions de Strontium						
pSr 6,6 = $2,5 \times 10^{-4}$	172	2,48	4,96	10		0,025
pSr 6,2 = $6,3 \times 10^{-4}$	172	2,48	4,94	10		0,060
pSr 5,8 = $1,6 \times 10^{-3}$	172	2,48	4,84	10		0,160
pSr 5,4 = $4,0 \times 10^{-3}$	172	2,48	4,62	10		0,368
pSr 5,0 = $1,0 \times 10^{-2}$	172	2,46	4,14	10		0,848
pSr 4,5 = $3,2 \times 10^{-2}$	172	2,44	2,98	10		2,024
pSr 4,0 = $1,0 \times 10^{-1}$	172	2,42	1,30	10		3,688

Chaque solution contient de l'adénosine triphosphate (2,5 mM). pH = $7,00 \pm 0,01$ pour toutes les solutions.

K-propionate = propionate de potassium ; Mg-acetate = acétate de magnésium ; MOPS = acide 3 morpholinopropane sulfonique

des différentes solutions sont calculées suivant le programme n° 3 de FABIATO et FABIATO (1979) de façon à maintenir la force ionique à 200 mM (tableau 2). Elles contiennent toutes du L propionate de potassium, de l'acétate de magnésium, du K_2 -EGTA, de l'acide 3 (morpholino) propane sulfonique (MOPS), du Ca-EGTA, et du Sr-EGTA (KERRICK et coll. 1976). Les constantes de stabilité d'ORENTLICHER utilisées sont $K_{Ca-EGTA} = 1.919 \times 10^6 M^{-1}$; $K_{Ca-ATP} = 5.0 \times 10^3 M^{-1}$; $K_{Mg-EGTA} = 40 M^{-1}$; $K_{Mg-ATP} = 1.0 \times 10^4 M^{-1}$ (FABIATO et FABIATO 1979). Le pH est ajusté à 7.00 ± 0.01 à l'aide de solutions d'hydroxyde de potassium ou d'acide propionique. L'EGTA est employé pour contrôler la concentration en calcium libre ou en strontium libre dans le milieu. Les concentrations sont exprimées pour le calcium en pCa selon : $pCa = -\log[Ca^{2+}]$ et pour le strontium en pSr selon : $pSr = -\log[Sr^{2+}]$. De l'ATP est ajouté dans toutes les solutions pour avoir une concentration constante de 2.5 mM. La solution de conservation (C) est constituée de 50 % de glycérol et de 50 % de solution de relax.

III.2.2.3 Etude de la réactivité à l'halothane du réticulum sarcoplasmique dépendante du type de fibre musculaire.

La fibre pelée est d'abord maintenue au repos dans la solution de relax. Après rinçage à deux reprises par une solution de wash (tableau 2), la réactivité de la fibre est vérifiée par l'application d'une solution calcique à $1.58 \times 10^{-5} M$ (pCa 4.8) (figure 13 dans Résultats). La fibre est ensuite replacée dans la solution relax. Un premier cycle d'étude est alors débuté. Après rinçage à deux reprises par la solution wash, le réticulum sarcoplasmique est chargé en calcium par incubation de la fibre pendant 30 secondes dans une solution de calcium à faible concentration ($1.58 \times 10^{-7} M$ soit pCa 6.8). Deux nouveaux rinçages par la solution wash permettent d'éliminer de la cuve le calcium non capté par le réticulum sarcoplasmique. L'halothane est alors appliqué sur la fibre, soit pendant une minute si aucune tension ne survient, soit jusqu'à l'obtention d'un plateau si la tension survient. Sur chaque fibre, 6 cycles sont réalisés correspondant à l'application d'halothane à des concentrations de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 vol %.

La solution d'halothane appliquée sur la fibre est obtenue en faisant barboter pendant 20 minutes de l'azote mélangé à de l'halothane délivré par le vaporisateur d'halogéné dans 10 ml de

solution de wash. Des études préliminaires, utilisant dans les mêmes conditions expérimentales le gaz vecteur (azote) seul, n'ont montré aucune contracture développée par les fibres. Les concentrations d'halothane délivrées par le vaporisateur (Fluotec Mark III) ont été vérifiées par un analyseur à infra-rouge (Datex). Les concentrations d'halothane délivrées par vaporisateur dans la solution expérimentale sont les suivantes : 0,5 % : $0,09 \pm 0,01$ mM ; 1 % : $0,21 \pm 0,01$ mM ; 2 % : $0,37 \pm 0,03$ mM ; 3 % : $0,70 \pm 0,05$ mM ; 4 % : $0,90 \pm 0,05$ mM ; 5 % : $1,01 \pm 0,01$ mM.

III.2.2.4 Etude de la sensibilité au calcium des protéines contractiles.

La fibre pelée est placée pendant 10 min. dans la solution relax contenant du Brij 58 (2 %). Le Brij 58, détergent non ionique, détruit toutes les membranes cellulaires, en particulier le réticulum sarcoplasmique sans altérer les protéines contractiles dont on peut alors étudier exclusivement le fonctionnement (ORENTLICHER et coll., 1974 ; ENDO M. et coll., 1983 ; TAKAGI A. et coll., 1983). La préparation est ensuite étirée de 20 % de sa longueur de repos. La destruction fonctionnelle du réticulum sarcoplasmique est ensuite vérifiée en étudiant la libération du calcium induite par la caféine (40 mM) après une charge calcique de 30 sec. L'absence de modification de la tension de base traduit la destruction totale du réticulum sarcoplasmique. Pendant toute la durée de l'expérimentation, réalisée à température ambiante (20 ± 1 °C), la longueur de la préparation est vérifiée et maintenue constante afin d'éviter toute variation de la sensibilité des myofilaments au calcium.

Pour chaque fibre squelettique pelée, une courbe Tension - pCa est réalisée en l'absence de tout agent anesthésique (solution contrôle). Cette courbe est obtenue en mesurant la tension isométrique développée par la préparation plongée dans des solutions de concentrations calciques croissantes (pCa 6.4 à 4.8) (figures 15, 17 dans Résultats). A chaque concentration, l'obtention d'une tension développée en plateau est attendue avant de passer à la solution suivante. A pCa 4.8, la concentration maximale étant obtenue, la relaxation de la fibre est obtenue grâce à la solution relaxante. Les tensions intermédiaires sont exprimées en pourcentage de la tension maximale (obtenue à pCa 4.8). La réactivité au calcium des protéines contractiles est exprimée par la valeur de la pCa50 et le coefficient de Hill.

Puis l'effet de l'halothane sur les protéines contractiles est étudié. Les solutions à concentration calcique donnée (pCa 6.4 - 4.8) contenant de l'halothane sont obtenues en faisant barboter pendant 20 min. de l'azote à travers un vaporisateur (FLUOTEC) délivrant de l'halothane à une concentration déterminée, dénommée selon la terminologie utilisée en anesthésie MAC 1 ou MAC 3 (MAC = Concentration Alvéolaire Minimale) correspondant respectivement à $0,48 \pm 0,03$ mM et $1,20 \pm 0,08$ mM d'halothane.

Une courbe Tension - pCa en milieu contrôle est réalisée à nouveau en fin d'expérimentation. Entre chacune des trois séries d'essais, la fibre pelée est laissée au repos pendant 10 min. dans la solution de relax. Les valeurs moyennes des deux courbes contrôles sont utilisées comme valeurs de référence.

III.2.2.5 Effet de l'halothane sur la tension maximale développée par les protéines contractiles squelettiques.

Au cours d'une autre série d'expérience, l'effet de l'halothane sur la tension isométrique maximale induite par le calcium est étudiée. Ce protocole permet la mise en évidence d'un éventuel effet inotrope négatif direct d'une substance sur les protéines contractiles. Chaque fibre pelée est exposée à une solution test de pCa 4.8 de façon à mesurer la tension maximale développée par la préparation en situation contrôle. Lorsque le niveau de tension a atteint son plateau, la fibre est mise au contact de la solution test contenant de l'halothane. Après stabilisation de la tension développée, la fibre est à nouveau mise au contact de la solution contrôle (figure 19 dans Résultats). La tension développée par la fibre en présence de l'halothane est comparée à la moyenne des deux tensions obtenues en condition contrôle. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur contrôle.

A la fin de chaque série d'expérience, un typage par le strontium est effectué pour déterminer la nature de la fibre.

III.3.3 ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. La comparaison entre les groupes pour un même paramètre est faite, après analyse de variance par le test de MANN-WHITNEY. Les pentes sont calculées par régression linéaire en utilisant la méthode des moindres carrés. Une valeur de $p < 0.05$ est exigée pour rejeter l'hypothèse nulle.

CHAPITRE IV**RESULTATS**

IV.1 EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LE COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE HUMAIN SENSIBLE A L'HYPERTHERMIE MALIGNNE

Nous nous sommes proposé d'évaluer dans un premier temps l'importance des modifications mécaniques que peuvent provoquer les contractures induites par l'halothane sur le muscle squelettique sensible à l'HM. Pour cela, l'influence de l'halothane sur les paramètres d'inotropie, de lusitropie et du couplage mécanique contraction-relaxation en isométrie a été comparée chez les sujets sensibles à l'HM et chez les sujets non sensibles. De plus, le lien éventuel qui existe entre la contracture et les paramètres mécaniques a été apprécié. L'ensemble des travaux a été réuni dans un projet d'article en voie de soumission.

Nos résultats montrent que, sur le muscle non sensible, l'halothane augmente les paramètres de contraction (PT , $+dP/dt_{max}$) d'environ + 40 % sans modifier le TPT . La vitesse de relaxation isométrique ($-dP/dt_{max}$) est également augmentée de près de + 40 %, avec un temps de demi-relaxation ($RT_{1/2}$) qui n'est pas significativement augmenté. Sur le muscle sensible à l'HM, les paramètres de contraction (PT , $+dP/dt_{max}$, TPT) ne sont pas significativement modifiés. La vitesse de relaxation isométrique ($-dP/dt_{max}$) est significativement diminuée. En revanche le temps de demi-relaxation ($RT_{1/2}$) est prolongé d'environ +20 %. Sur le muscle non sensible à l'HM, les effets inotrope et lusitrope positifs de l'halothane ne sont pas associés à un effet relaxant attesté par une absence de modification du coefficient R . En revanche, sur les muscles sensibles à l'HM, l'effet relaxant négatif observé est la résultante d'un effondrement de la vitesse de relaxation isométrique.

Le niveau de contracture induite par les concentrations croissantes d'halothane est significativement corrélé avec les paramètres de relaxation ($RT_{1/2}$, $-dP/dt_{max}$) et le couplage contraction-relaxation. A l'inverse, les paramètres de contraction ne sont pas corrélés avec la contracture. Notre étude a montré que sur le muscle HM, l'halothane induit une contracture et altère les propriétés mécaniques intrinsèques du muscle. Cette modification des paramètres de relaxation est compatible avec un dysfonctionnement du système membranaire, en particulier du

réticulum sarcoplasmique. En effet, il a été proposé qu'une anomalie fonctionnelle du canal réticulaire et/ou des récepteurs à la ryanodine serait le principal responsable d'une augmentation considérable du taux de calcium libre intramyoplasmique dans le muscle sensible à l'HM. Cette augmentation importante de calcium intramyoplasmique serait si importante que les possibilités de régulation de la cellule se trouveraient dépassées. Même si les différents mécanismes d'extrusion du calcium (pompe calcique, échange Na^+ - Ca^{2+}) fonctionnent correctement, ceux-ci ne peuvent faire face à cette véritable autointoxication de la cellule par le calcium.

Cette hypothèse permet d'expliquer en partie le lien qui existe entre le développement d'une contracture musculaire et l'altération progressive des différents paramètres de la relaxation. Le coefficient R augmente en même temps que la contracture devient importante, témoin d'une relation étroite entre mécanisme de contraction rapide et les mécanismes de contracture.

Dans le muscle strié, le recaptage du calcium utilisé pour la contraction dépend de la pompe à calcium c'est-à-dire la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase dépendante du réticulum sarcoplasmique (RS). Dans la pathologie de l'HM, certains auteurs ont observé une anomalie dans le relargage du calcium par le RS (ENDOHO et coll., 1983 ; OHNISHI et coll., 1989) sans que la fonction de repompage du calcium par le RS ne soit affectée. L'augmentation significative du temps de demi-relaxation ($\text{RT}_{1/2}$) des muscles sensibles à l'HM pourrait refléter une diminution de la cinétique de recaptage du calcium dans le RS par la pompe Ca - Mg -ATPase. Dans le but de comparer la fonction de recaptage du RS des muscles squelettiques de sujets sensibles (HMS) et de sujets non sensibles (HMN), nous avons utilisé l'acide cyclopiazonique (CPA), un inhibiteur spécifique de la pompe Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase.

HALOTHANE ALTERS THE CONTRACTION-RELAXATION COUPLING IN MALIGNANT HYPERTHERMIA HUMAN SKELETAL MUSCLE.

TOUSSAINT S. ETCRIVI, PASCAL J. ADNET, HUGO G. REYFORD,
GHISLAIN HAUDECOEUR, BENOIT TAVERNIER, RENEE M. KRIVOSIC-
HORBER

Département d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale I et II, CHU de
Lille and Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine,
59037 Lille, France

Running title : MUSCLE RELAXATION AND HALOTHANE

Address correspondence to :

Dr. ADNET, Département d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale I,
Hôpital B, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 59037 LILLE
Cédex France

Tél : 20.44.62.69

Fax : 20.44.65.51

Acknowledgments

This work was supported in part from the Association Française contre les myopathies and from
the Faculty of Medicine.

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to compare the effects of halothane on malignant hyperthermia (MH) and normal skeletal muscle performance during isometric contraction and relaxation phases. Muscle fiber bundles dissected from vastus lateralis muscle were mounted at optimal length in normal Ringer's solution. Peak tension (PT), time to peak tension (TPT), positive peak of isometric force derivative ($+dF/dT_{max}$), half relaxation time ($RT_{1/2}$) and negative peak of isometric force derivative ($-dF/dT_{max}$) were measured prior to and during halothane administration at increasing concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, and 3.0 % halothane. The calculated ratio $R = (+dF/dT_{max}) / (-dF/dT_{max})$ was used as an index which related the coupling between contraction and relaxation under isometric condition. In normal muscle, halothane increased PT by nearly 40 % without altering TPT. The $+dF/dT_{max}$ value increased concomitantly with the $-dF/dT_{max}$ values, thus no changes in R was observed. In MH muscle, PT was first potentiated (0.5 - 1.0 % halothane) and then depressed (2.0 - 3.0 % halothane). TPT and $+dF/dT_{max}$ were not altered whereas $RT_{1/2}$ increased progressively with concomitant decrease in $-dF/dT_{max}$, thus R increased by nearly 40 %. The amplitude of MH muscle contracture with stepwise concentrations of halothane was correlated with the increase of $RT_{1/2}$ and R, and the decrease of $-dF/dT_{max}$. These results suggest that halothane alters the contraction-relaxation coupling in MH-human skeletal muscle under isometric condition and this effect is correlated with muscle contracture.

Key words : muscle contraction. muscle contracture. muscle relaxation. halothane. inotropic effect.

INTRODUCTION

Malignant hyperthermia (MH) is a potentially fatal condition that can be induced by halothane exposure in susceptible individuals. Alterations in ryanodine receptors / Ca^{2+} channel activities²⁷ seem to be the primary defect responsible for the abnormal sarcoplasmic (SR) calcium release mechanism observed both in SR vesicles^{17, 22} and in skinned muscle fibers^{26, 24, 9, 3}. Other secondary defects in the excitation-contraction (EC) coupling mechanism by which surface membrane depolarization initiates SR calcium release have also been described. For example, MH-susceptible (MHS) muscle has been reported to show a slight halothane-induced depolarization¹². Other non anesthetic-induced abnormalities including 1) a lower threshold for response to either potassium¹³ or Bay K 8644 (calcium-channel agonist)¹ and 2) different abnormal electromechanical coupling^{21, 29}, suggest an increased in excitability and facilitated EC coupling.

Isolated SR vesicles from MH-susceptible muscle release a greater amount of calcium^{17, 26}. Skinned muscle fiber from MHS humans or pigs also demonstrated a lower threshold for calcium release^{3, 9, 24, 26}. However, neither in isolated SR nor in skinned fiber preparation, was the rate of calcium uptake by the SR changed. Likewise, the calcium sensitivity of the contractile system of MHS fibers were not different from those of normal fibers, and halothane in an anesthetic concentration exerted no effect on them²⁴. Thus, we would expect that intact MHS fiber develops greater force and more rapid tension during the contraction phase (positive inotropic effect) with only little change in the relaxation phase. However, experimental results relevant to this prediction are not entirely consistent with these experimental observations since both contraction and relaxation are reported to be altered, but many discrepancies exist among the various reports of time course parameters^{14, 21, 25}. Therefore, the reported calcium regulation changes in both SR vesicles and skinned fiber preparations cannot account for all the differences between MHS and normal muscles in the presence of halothane. Hence, some other defects may contribute to the halothane-induced alterations in force generation observed in segments of muscle bundles used for diagnostic purposes^{10, 23}.

The present investigation was conducted to determine to what degree MH-related changes in regulation of SR are reflected by altered time course of mechanical responses from

human muscle bundles. To this end, the relationship between contraction and relaxation was studied by measuring different mechanical parameters that couple the contraction phase to the relaxation phase under isometric conditions in MHS and normal muscle ⁵. Abnormal responses of MHS muscle bundles were also evaluated to determine whether any might have diagnostic value.

METHODS

In vitro contracture tests.

Twenty-seven patients were selected for diagnostic muscle biopsy based on suspicion of susceptibility to MH. After approval from the Lille University Human Studies Committee and informed consent obtained from the patients, extra muscle was removed. Halothane and caffeine contracture tests were performed as previously described³. The muscle used for the diagnostic test was the vastus lateralis. All patients were investigated according to the protocol supported by the European MH group¹⁰. The criteria of MH susceptibility (MHS) were an increase in resting tension of at least 0.2 g both with a halothane threshold concentration $\leq 2\%$ (in the gas phase) and a caffeine threshold concentration ≤ 2 mM. A normal response (MHN) was defined as a halothane threshold $\geq 2\%$ and a caffeine threshold ≥ 2 mM. Other results (i.e. one abnormal response either with halothane or with caffeine) were classified as MH-equivocal, but these patients were not included in this study since the significance of these results is not known. In addition, a 3% halothane test was performed on one muscle fiber bundle according to the protocol supported by the North American MH group²³. The patient was diagnosed as MHS if the muscle fiber bundle exhibited a contracture ≥ 0.5 g within 10 min of 3% halothane (in the gas phase) exposure.

SOLUTIONS.

For all experiments, a Krebs-Ringer (KR) solution containing (in mM) 118.1 NaCl, 3.4 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.8 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 11.1 glucose was used. The pH was 7.35 ± 0.05 and the solution was bubbled with preheated 5% carbon dioxide in oxygen. Halothane concentrations incremental were administered by bubbling the muscle bath with a calibrated vaporizer (Fluotec Mark III). The anesthetic concentration in the gas phase was monitored continuously with an infrared calibrated analyzer (Normac R, Datex). The anesthetic concentrations obtained in the KR solution were measured by gas-liquid chromatography (GLC) to determine the amount of anesthetic present in the test solution. A varian 1400 R gas

chromatograph equipped with a flame ionization detector and a Porapak QR 3.17 mm by 150 cm column was used for determination of anesthetic concentration ¹⁶. A 60 ml flask containing 100 μ l of the solution equilibrated 15 min with the anesthetic was maintained at 60°C (above the boiling point of halothane) for 20 min before injection of gas into the apparatus, previously calibrated with known concentrations of the anesthetic (head space technique). The anesthetic concentrations measured in the experimental solutions after continuous bubbling were as follows ; 0.5 % : 0.09 ± 0.01 mM ; 1 % : 0.21 ± 0.01 mM ; 2 % : 0.37 ± 0.03 mM ; 3 % : 0.70 ± 0.05 mM.

Isolated muscle preparation.

The biopsies were taken from the vastus lateralis muscle. Segments of muscle bundles (18 - 22 mm in length and 2 - 3 mm in diameter) were carefully dissected from the biopsies. As transected fibers were used for the study, predrug resting membrane potentials (RMP) were recorded in each muscle fiber bundle as previously described ². All fiber segments tested (at least 15 per muscle bundle) had RMP ranging between - 80 and - 85 mV indicating no transection-induced significant depolarization of the fibers. Muscle bundles were then mounted in a temperature-controlled (37° C) muscle chamber (4 ml) which was perfused continuously (4 - 5 ml/min) with KR solution. One end was pinned to the silicone bottom of the muscle chamber, the other end of the muscle bundle was attached by a thin silk thread to a force transducer (Bioscience Dynamometer UFI and Biological Amplifier 120). The preparations were stimulated directly using silver electrodes with rectangular current pulses of 1 ms duration delivered at a frequency of 0.2 Hz by a stimulator CEA-DAM model GPI-GE2198. The optimal length was determined by increasing the voltage to supramaximal twitch tension and then increasing the length to achieve absolute twitch tension. After a stabilization period of 30 min., the experiments were performed at L_{max}, i.e., the initial length corresponding to the apex of the length-active tension curve. For diagnostic procedure, baseline and twitch tension were recorded continuously at low speed on a Siemens C1013. Isometric mecanograms were recorded on a Gould model type 4035 oscillographic recording system, equipped with a model carrier

preamplifier and a model 120 high-gain preamplifier. The first derivative of developed tension dF/dT was obtained by an RC differentiator with a time constant of 2.5 ms.

Experimental recording.

In order to characterize both MH and normal skeletal muscle performance during the isometric contraction and relaxation phases, classical mechanical parameters at L_{max} were measured prior to the administration of halothane, at increasing concentrations of 0.5, 1, 2, and 3 % halothane and at 3 % bolus halothane. After allowing for stabilization of the effect of each dose, recording of tension and its first derivative with respect to time were obtained at high speed recording. Peak tension (PT), time to peak tension (TPT) and positive peak of isometric force derivative per cross-sectional area (CSA) ($+dF/dT_{max}/cm^2$) ($mN/s/cm^2$) characterized the contraction phase (fig.1). Half-relaxation time (RT 1/2) and negative peak of isometric force derivative per CSA ($-dF/dT_{max}/cm^2$) ($mN/s/cm^2$) were used to study the relaxation phase. As relaxation phase depends on the degree of contraction phase, simultaneous variations of the two phases should be considered in order to quantify possible halothane-induced changes in relaxation phase. Hence one additional parameter, R was measured : Coefficient $R = (+dF/dT_{max}) / (-dF/dT_{max})$ represented the ratio of peak force derivatives of the isometric twitch at L_{max} during the contraction and relaxation phases, respectively. This parameter has been validated as an index which tests the coupling between contraction and relaxation under isometric condition ⁵.

Following the experiment each muscle strip was blotted dry and weighed. Cross-sectional area (CSA) was calculated as muscle weight (g) / (muscle length x 1.06). Peak force evoked by electrical stimulation is expressed in millinewton per square centimeter.

Data are expressed as means \pm SE. After analysis of variance, Student's unpaired t-test was used to compare mean values. Relationships between relaxation parameters and contracture were examined by least-squares linear regression. All comparisons were two tailed, and $P < 0.05$ was necessary to reach significance.

RESULTS

In vitro contracture test.

The contracture test results of the 27 patients are shown in Table 1. Twelve of the 27 patients were diagnosed as MH susceptible (MHS) on the basis of halothane and caffeine-induced muscle bundle contractures. The 3 % halothane test responses were particularly large in MHS skeletal muscle.

Mechanical properties in control conditions.

The twitch characteristics of the in vitro MHS and normal vastus lateralis muscle bundles are shown in Table 2. In the absence of halothane, PT, TPT and $+dF/dT_{max}$ are comparable between groups of MHN and MHS muscle bundles. When the relaxation phase of the 2 groups are compared, $RT_{1/2}$ and $-dF/dT_{max}$ did not distinguish MHS from normal muscle. However the calculated coefficient R was significantly higher than that of normal muscle at the beginning of the experiment indicating that the coupling between contraction and relaxation under isometric condition was different between groups of muscle in the absence of halothane.

Effects of incremental concentrations of halothane.

In normal muscle, halothane increases PT by nearly 40 % (from 0.5 to 3 % halothane) without significantly altering TPT except at the highest concentration of halothane (3 %). Likewise $RT_{1/2}$ was not significantly increased with concentrations of halothane. The $+dF/dT_{max}$ increases concomitantly with the increase of the peak rate of tension decline ($-dF/dT_{max}$). Thus no change in coupling between contraction and relaxation under isometric condition was observed. Typical effects of halothane on contraction and relaxation phases in MHS muscles are shown in fig. 2. In MHS muscle, exposure to increasing concentrations of halothane (0.5 - 1 %) first potentiated PT by only 10 % and then depressed it (2 - 3 %). TPT and $+dF/dT_{max}$ were not significantly altered whereas $RT_{1/2}$ increased progressively with concomitant decrease in $-dF/dT_{max}$. Thus coefficient R increases significantly by nearly 40 %

indicating that the relaxation phase was more affected by halothane than the contraction phase under isometric conditions.

Correlation coefficients for contraction-relaxation parameters versus contracture in MH muscle at each concentration of halothane are given in Table 3. No correlation was found for parameters of the contraction phase (PT, TPT, $+dF/dT_{max}$), whereas there was a positive correlation for $RT_{1/2}$, R and a negative correlation for $-dF/dT_{max}$. The increase of muscle contracture with stepwise concentrations of halothane was correlated with the increase of $RT_{1/2}$ and R, and the decrease of $-dF/dT_{max}$.

Effects of 3 % bolus halothane.

Mean changes in intrinsic mechanical parameters are presented in Table 4. In normal muscle, the inotropic effect of 3 % halothane resulted in an increase in PT without altering TPT and $RT_{1/2}$. The R coefficient was not modified as the increase of $+dF/dT_{max}$ was similar to the increase of $-dF/dT_{max}$. In MHS muscle, all mechanical parameters of the relaxation phase were altered in the presence of 3% bolus halothane. Thus coefficient R increased significantly by nearly 40 % of the control value.

DISCUSSION

That the isometric twitches of MHS and normal muscles respond differently to halothane were clearly demonstrated by this study. An unexpected finding was the unequivocally different response of the relaxation phase between MHS and normal muscle. In MHS muscle, all the parameters of relaxation were consistently and reproducibly altered when exposed to clinically relevant concentrations of halothane (0.5 to 3 %). In contrast, normal muscle studied in an identical manner never demonstrated such responses.

Many fundamental differences in skeletal muscle from MHS and normal pigs or humans have already been described ^{21, 14, 25, 4, 11, 30, 31} but comparative studies between twitch responses of MHS and normal muscle in humans are lacking. The results of the present study demonstrate that halothane affects to a greater extent the relaxation phase than the contraction phase in human MH muscle compared to normal muscle. As the relaxation phase depends greatly on the contraction phase, coupled variations of contraction and relaxation should be considered to quantify the halothane-induced changes in the relaxation phase. Coefficient R measures the coupling between contraction and relaxation under isometric conditions ⁵. An increase in coefficient R characterizes a negative relaxant effect and this was consistently observed in MHS muscle in the presence of either increasing concentrations or bolus dose of halothane. In normal muscle, the positive inotropic effect elicited by increasing concentrations of halothane was not associated with an altered relaxant effect. Thus, no change in the R coefficient was observed indicating a proportional increase in maximal velocity of contraction and relaxation. This finding indicates that halothane has no other effect on relaxation phase other than those existing as a consequence of its effects on contraction. Since no overlap exists between ranges in R coefficient between normal and MHS twitches at 3% halothane, this parameter may be useful to discriminate between MHS versus normal muscles.

Our results differ from those reported by Gallant and Goettl in intact and cut muscle bundles from pigs, showing that halothane caused a potentiation of twitch force in both normal and MHS muscle ^{14, 15}. This potentiation resulted from an increased rate of rise of tension with no change in time to peak. However, no significant effect was observed on the relaxation phase

obtained with twitches¹⁵. Only the tetanus relaxation of MHS muscle was slowed by halothane leading the authors to suggest that the calcium sequestering mechanisms of MHS pig muscles are adequate for removal of calcium released by a single stimulus but became overloaded or saturated during a tetanus¹⁵. Our method differs mainly by the use of cut fiber preparation. Hence our findings that halothane alters the contraction-relaxation coupling of MH muscle may be less related to the E-C coupling process per se than to the fatigability of these cut fiber preparations. However, it has been demonstrated recently that such muscle cells may reseal with time and that these preparations may be far more physiological than appreciated in the past¹⁸.

The precise mechanisms by which halothane increases normal skeletal muscle twitches and alters the relaxation phase of MH muscle are not fully understood. In normal muscle, the peak rate of tension development ($+dF/dT_{max}$) increases concomitantly with PT whereas TPT and RT1/2 are only slightly prolonged. This suggests that, during the period of halothane-induced twitch potentiation, the muscle active state is enhanced rather than prolonged. Intensification of the active state could be accomplished either by increasing myofilament sensitivity to Ca^{++} or by increasing myoplasmic Ca^{++} concentration during the twitch. In MH muscle, the biphasic effects of halothane on PT and $+dF/dT_{max}$ are associated with a progressive increase in RT1/2 and in coefficient R suggesting that the MH muscle active state is prolonged rather than (or in addition) enhanced. Prolongation of the active state could be accomplished by increasing myofilament sensitivity to Ca^{++} or by an elevated Ca^{++} residual remaining in the myoplasm after the twitch. However, both in MH and normal muscles, it is unlikely that increased myofilament sensitivity to Ca^{++} contributes to the inotropic and relaxant effects of halothane because the pCa-tension relationship is neither increased nor shifted to the left by halothane²⁴. In MH muscles, an elevated Ca^{++} residual remaining could exist free or bound to Ca-binding proteins such as troponin. Thus, the increase in Ca^{++} residual remaining in the myoplasm could explain a progressive decline in relaxation rate correlated with a progressive change in resting tension (contracture). The decline in relaxation rate of MH muscle in the presence of halothane might be due in part to a decrease in Ca-uptake by the SR. These alterations in Ca^{++} SR uptake function could be related to the increase in Ca^{++} content in terminal cisternae of SR in MH fibers since a Ca^{++} overload in SR inhibits its pumping activity²⁸. In

addition, the intracellular acidosis caused by halothane-induced MH muscle contracture might also inhibit SR ATPase¹⁹. However it is unlikely that decrease in the rate of Ca-uptake by the SR contributes to the negative lusitropic effects of halothane because the slope of the initial part of loading time-Ca⁺⁺ uptake curve are neither increased nor shifted to the left by halothane²⁴.

It appeared in previous studies, that a clearcut differentiation has always been made between the effects of halothane on twitch tension and muscle contracture^{1, 6, 7, 30, 31}. It has been demonstrated that halothane causes a concentration-dependant positive inotropic effect in human¹ and in a variety of mammalian species^{6, 7, 11, 30}. Its positive inotropic effect has been attributed to interference with transsarcolemmal Ca⁺⁺ influx but other findings argue against the notion that halothane effects are influenced, in part, by extracellular Ca⁺⁺. Perhaps the abnormal intracellular Ca⁺⁺ exchange (Ca-induced-Ca-release mechanism⁸) would explain mainly the increased sensitivity and Ca⁺⁺ release rate of MHS-SR^{9, 24}. Clearly, additional studies are needed to fully identify the main mechanism and the difference in the degree of effectiveness of other mechanisms involved. To this end, the link between relaxation and MH muscle contracture, demonstrated in the current study, may help towards a better understanding of halothane effects.

In summary, the present data show that halothane influences the degree of coupling between contraction and relaxation in MH muscle. The negative relaxant effects of halothane on twitch muscle are linked to muscle contracture. This suggests that abnormal increase of myoplasmic Ca⁺⁺ overwhelms the SR pumping capacity and reaches a level such that cross-bridge formation persists and leads to muscle contracture.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adnet PJ, Krivosic-Horber RM, Adamantidis MM, Haudecoeur G, Reyford HG, Dupuis B : Effects of calcium-free solution, calcium antagonists, and the calcium agonist Bay K 8644 on mechanical responses of skeletal muscle from patients susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1991; 75: 413-419.
2. Adnet PJ, Krivosic-Horber RM, Adamantidis MM, Haudecoeur G, Reyford HG, Dupuis B : Is resting membrane potential a possible indicator of viability of muscle bundles used in the in vitro caffeine contracture test ? *Anesth Analg* 1992; 74: 105-111.
3. Adnet PJ, Bromberg NL, Haudecoeur G, Krivosic I, Adamantidis MM, Reyford H, Krivosic-Horber RM : Fiber-Type caffeine sensitivities in malignant hyperthermia human skinned muscle fibers. *Anesthesiology* 1993; 78 : 168-177.
4. Campion DR, Eikelenboom G, Cassens RG : Isometric contractile properties of skeletal muscle from stress susceptible and stress resistant pigs. *J Am Scie* 1974; 39 : 68 - 72.
5. Chemla D, Lecarpentier Y, Martin JL, Clergue M, Antonetti A, Hatt PY : Relationship between inotropy and relaxation in rat myocardium. *Am J Physiol* 1986; 250 (Heart Circ. Physiol. 19) : H 1008 - H 1016.
6. Deuster PA, Bockman EL, Muldoon SM : In vitro responses of cat skeletal muscle to halothane and caffeine. *J Appl Physiol* 1985; 58: 521-527.
7. Deuster PA, Bockman EL, Biscardi H, Muldoon SM : Verapamil and zero Ca²⁺ alter responses of cat muscle to halothane and caffeine. *J Appl Physiol* 1986; 60 (3) : 935-941.

8. Endo M, Tanaka M, Ogawa Y : Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature Lond* 1970; 228: 34-36.
9. Endo M, Ysugi S, Ishizuka T, Horiuti K, Koga Y, Amaha K : Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia. *Biomed Res* 1983; 4 : 83-92.
10. European Malignant Hyperpyrexia Group : A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anesth.* 1984; 56: 1267-1269.
11. Gallant EM, Godt RE, Gronert GA : Mechanical properties of normal and malignant hyperthermia susceptible porcine muscle: Effects of halothane and other drugs. *J.Pharmacol Exp Ther* 1980; 213 : 91-96.
12. Gallant EM : Histochemical observations on muscle from normal and malignant hyperthermia susceptible swine. *Am J Vet Res* 1980; 41 : 1069 - 1071.
13. Gallant EM, Gronert GA, Taylor SR : Cellular membrane potentials and contractile threshold in mammalian skeletal muscle susceptible to malignant hyperthermia. *Neurosci lett* 1982; 28: 181 - 186.
14. Gallant EM, Fletcher TF, Goettl VM, Rempel WE : Porcine malignant hyperthermia : Cell injury enhances halothane sensitivity of muscle biopsies. *Muscle Nerve* 1986; 9 : 174 - 184.
15. Gallant EM, Goettl VM. Porcine malignant hyperthermia : Halothane effects on force generation in skeletal muscles. *Muscle Nerve* 1989; 12 : 56 - 63.
16. Imbenotte M, Erb F, Golstein P, Erb C, Scherpereel P : Halothane and enflurane metabolite elimination during anaesthesia in man. *Eur J Anaesth.* 1987; 4: 175-182.

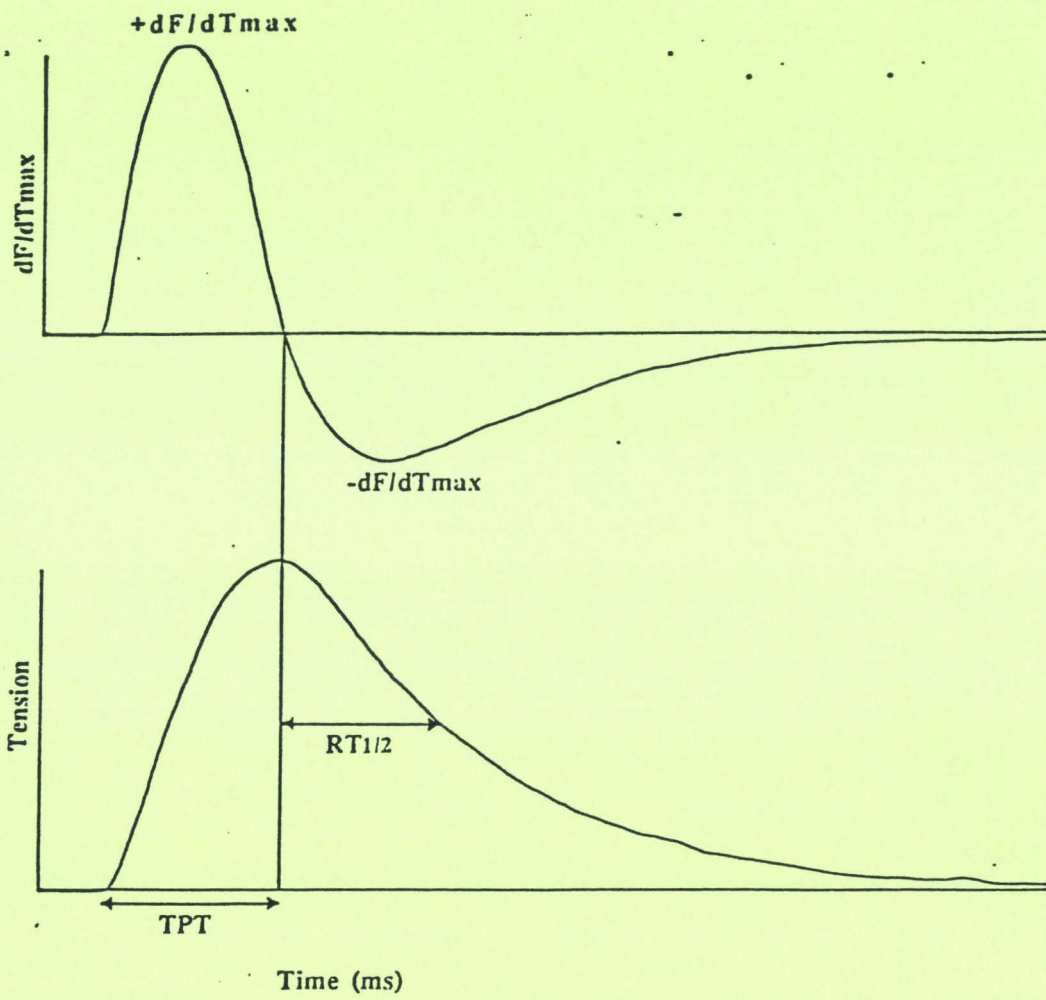
17. Kim DH, Sreter FA, Ohnishi ST, Ryan JF, Roberts J, Allen PD, Meszaros LG, Antonius B, Ikemoto N : Kinetic studies of Ca²⁺-release from sarcoplasmic reticulum of normal and malignant hyperthermia susceptible pig muscles. *Biochim Biophys Acta* 1984; 775 : 320 - 327.
18. Lehmann-Horn F, Iaizzo PA : Resealed fiber segments for the study of the pathophysiology of human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1990; 13 : 222 - 231.
19. Metzger JM, Fitts RH : Role of intracellular pH in muscle fatigue. *J Appl Physiol* 1987; 62: 1392-1397.
20. Mickelson JR, Gallant EM, Litterer LA, Johson KM, Remple WE, Louis CF : Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* 1988; 263: 9310-9315.
21. Nelson TE, Flewellen EH, Arnett DW : Prolonged electromechanical coupling time intervals in skeletal muscle of pigs susceptible to malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1983; 6 : 263 - 268.
22. Nelson TE : Abnormality in calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum of pig susceptible to malignant hyperthermia. *J Clin Invest* 1983; 72: 862 - 870.
23. North American Malignant Hyperthermia Group : Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesth Analg* 1989; 69: 511-515.
24. Ohta T, Endo M, Nakano T, Morohoshi Y, Wanikawa K, Ohga A : Ca-induced Ca release in malignant hyperthermia-susceptible pig skeletal muscle. *Am J Physiol* 1989; 256 (Cell Physiol 25) : C 358 - C 367.

25. Reiss G, Monin G, Lauer C : Comparative effects of the ionophore A23187 on the mechanical responses of muscle in normal pietrain pigs and pigs with malignant hyperthermia. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; 64 : 248 - 253.
26. Salviati G, Betto R, Ceoldo S, Tegazzin V, Della Puppa A : Caffeine sensitivity of sarcoplasmic reticulum of fast and slow fibers from normal and hyperthermia human muscle. *Muscle Nerve* 1989; 12: 365-370.
27. Shomer NH, Louis CF, Fill M, Litterer LA, Mickelson JR : Reconstitution of abnormalities in the malignant hyperthermia-susceptible pigs ryanodine receptor. *Am J Physiol* 1993; 264 (Cell Physiol 33) : C125 - C135.
28. Vitres N, Aubier M, Murciano D, Fleury B, Thalamo C, Pariente R : Effects of aminophylline on diaphragmatic fatigue during acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 396-402.
29. Wieland SJ, Fletcher JE, Rosenger GH, Qui-Hua Gon : Malignant hyperthermia : slow sodium current in cultured human muscle cells. *Am J Physiol* 1989; (Cell Physiol 26) : C759 - C765.
30. Williams JH, Holland M, Lee JC, Ward CW, Davy KP : Effects of BAYK 8644, nifedipine, and low Ca^{++} on halothane and caffeine potentiation. *J Appl Physiol* 1991; 71 (2) : 721-726.
31. Williams JH, Holland M, Lee JC, Ward CW, McGrath CJ : BAY K 8644 and nifedipine alter halothane but not caffeine contractures of malignant hyperthermic muscle fibers. *Am J Physiol* 1991; 261 (Regulatory Integrative Comp Physiol 30) : R 782- R 786.

LEGENDS OF FIGURES

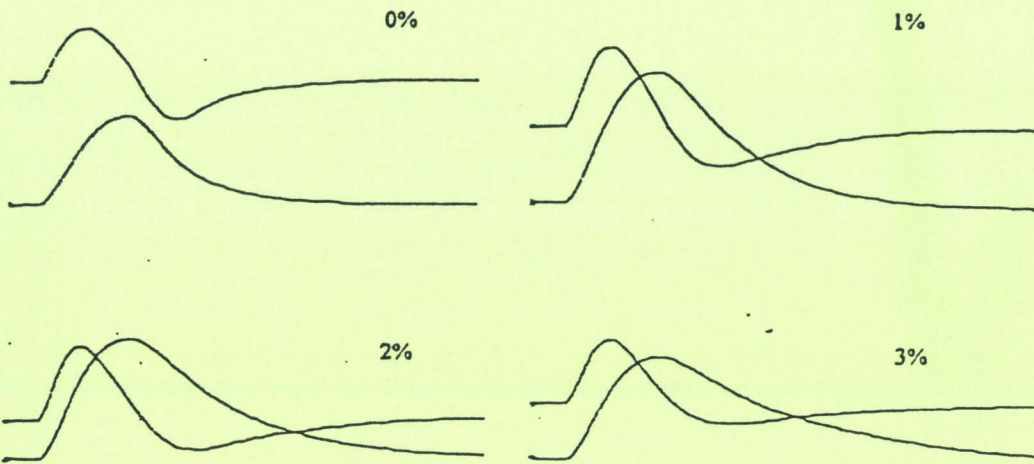
Fig. 1: Example illustrating method used to obtain different mechanical parameters for normal and malignant hyperthermia susceptible muscle. TPT, time to peak tension; RT_{1/2}, half relaxation time; dF/dT_{max}, peak of isometric force derivative (+ positive and - negative).

Fig. 2: Effects of increasing concentrations of halothane (1 to 3 %) on mechanical parameters illustrated in fig. 1 of malignant hyperthermia susceptible (MHS) muscle. TPT and +dF/dT_{max} were not altered whereas RT_{1/2} increased with concomittant decrease in -dF/dT_{max}. The increase of muscle contracture with stepwise concentrations of halothane was correlated with the increase of RT_{1/2} and the decrease of -dF/dT_{max}. See text for explanation of abbreviations.



2-1

MHS



for

TABLE 1. Contracture responses of patients diagnosed as MHN or MHS by halothane and caffeine contracture test

Diagnosis	n	Contracture g		
		Halothane I	Halothane II	Caffeine I
MHN	15	0	0.06 ± 0.02	0
MHS	12	1.88 ± 0.37*	2.34 ± 0.43*	0.42 ± 0.31*

Values are means ± SEM; n, n°. of patients. Halothane I represents maximum contracture at 2 vol % halothane performed according to the European MH protocol. Halothane II represents maximum contracture within 10 min. to 3 vol % bolus halothane performed according to the North American MH protocol. Caffeine I represents maximum contracture at 2 mM caffeine. MHS, susceptible to malignant hyperthermia MHN, not susceptible to malignant hyperthermia

* Significantly different ($P < 0.05$) from MHN by two tailed unpaired t test.

TABLE 2. Intrinsic mechanical properties of muscle bundles from 12 patients susceptible to Malignant Hyperthermia (MHS) and 15 patients non susceptible to malignant hyperthermia (MHN) under control conditions and in response to increasing concentrations of 0.5, 1, 2, and 3 % halothane.

		control	0.5	1	2	3
PT (mN/cm ²)	MHN	468 ± 34	480 ± 36*	542 ± 37*	610 ± 42*	661 ± 44*
	MHS	466 ± 47	494 ± 40	513 ± 46	503 ± 54	454 ± 55 †
TPT (ms)	MHN	80 ± 2	81 ± 2	81 ± 2	83 ± 2	85 ± 2*
	MHS	81 ± 2	83 ± 2	83 ± 2	82 ± 2	84 ± 3
+dF/dTmax/cm ² (mN/s/cm ²)	MHN	8369 ± 591	8268 ± 676*	9301 ± 726*	10137 ± 743*	10794 ± 657*
	MHS	8164 ± 715	8634 ± 694	9262 ± 813	9177 ± 983	7971 ± 959 †
RT1/2 (ms)	MHN	82 ± 4	82 ± 4	83 ± 4	84 ± 4	83 ± 3
	MHS	89 ± 6	93 ± 5	104 ± 7* †	113 ± 9* †	127 ± 11* †
-dF/dTmax/cm ² (mN/s/cm ²)	MHN	3758 ± 315	3820 ± 328*	4472 ± 349*	4867 ± 395*	5086 ± 400*
	MHS	3393 ± 403	3419 ± 435	3283 ± 426 †	3004 ± 438 †	2504 ± 451* †
R	MHN	2.16 ± 0.11	2.11 ± 0.10	2.03 ± 0.10	2.03 ± 0.10	2.16 ± 0.1
	MHS	2.6 ± 0.18 †	2.71 ± 0.18* †	3.05 ± 0.22* †	3.35 ± 0.22* †	3.56 ± 0.26* †

Values are mean ± SEM ; * p < 0.05 versus control within groups of either MHN or MHS muscles.

† P < 0.05 between groups MHN and MHS muscles. See text for explanation of abbreviations.

TABLE 3. Correlation coefficient for Halothane-induced contracture and contraction-relaxation parameters of 12 Malignant Hyperthermia Susceptible muscles.

Covariate	No. of muscle bundles	PT	TPT	+dF/dTmax/cm ²	RT1/2	-dF/dTmax/cm ²	R
Halothane-induced contracture.	12	0.02	0.54	0.11	0.96**	0.88*	0.99**

*p < 0.05 ; **p < 0.001.

TABLE 4. Intrinsic mechanical properties of muscle bundles from 12 patients susceptible to Malignant Hyperthermia (MHS) and 15 patients non susceptible to Malignant Hyperthermia (MHN) under control conditions and in response to 3% bolus halothane.

		control	3%
PT (mN/cm ²)	MHN	452 ± 60	602 ± 63*
	MHS	408 ± 60	423 ± 44 †
TPT (ms)	MHN	80 ± 5	82 ± 5
	MHS	79 ± 4	80 ± 5
+dF/dTmax/cm ² (mN/s/cm ²)	MHN	7611 ± 812	10374 ± 1003*
	MHS	7406 ± 1321	8019 ± 1025 †
RT1/2 (ms)	MHN	80 ± 8	82 ± 4
	MHS	81 ± 7	117 ± 11* †
-dF/dTmax/cm ² (mN/s/cm ²)	MHN	3663 ± 347	5036 ± 594*
	MHS	3362 ± 547	2505 ± 294* †
R	MHN	1.96 ± 0.14	2.14 ± 0.13
	MHS	2.20 ± 0.16 †	3.18 ± 0.24* †

Values are mean ± SEM ; *p < 0.05 versus control within groups of either MHN or MHS muscles. † P < 0.05 between groups of MHN and MHS muscles. See text for abbreviations.

IV.2 INFLUENCE DU BLOCAGE DU RECAPTAGE DU CALCIUM PAR LA Ca^{2+} -ATPase RETICULAIRE SUR LES EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LE COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION : EFFETS DE L'ACIDE CYCLOPIAZONIQUE (CPA)

L'inhibition de l'activité de la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (RS) est obtenue par l'exposition des préparations à l'acide cyclopiazonique (CPA) qui est une mycotoxine produite par certains champignons de type *aspergillus*. Ceci a été démontré sur des vésicules isolées de RS de muscle squelettique et cardiaque, et sur du muscle papillaire de rat par plusieurs auteurs (GOEGER et coll., 1989 ; SEIDLER et coll., 1989 ; PERY et coll., 1993). L'inhibition de la pompe Ca^{2+} -ATPase provoquerait une surcharge calcique intramyoplasmique sur le muscle squelettique. Puisque l'halothane par lui-même induit une surcharge calcique de la cellule musculaire avec à terme une contracture et une modification de l'ensemble des paramètres de relaxation, il est permis de penser que la présence du CPA renforce la capacité de l'halothane à induire cette surcharge calcique qui se produira alors pour des concentrations plus basses d'halothane.

Le but du travail présenté a été de caractériser le comportement mécanique du muscle HMN et HMS après inhibition de l'une des principales fonctions du RS à l'aide de cet outil pharmacologique. Notons que le CPA utilisé à la concentration de 10 μM , n'exerce pas d'effet inotrope négatif sur le muscle normal.

IV.2.1 EFFETS DU CPA SUR LA CONTRACTURE.

L'étude a été réalisée sur 9 muscles de sujets non sensibles à l'HM, et de 5 muscles de sujets sensibles à l'HM. Un exemple de tracé représentatif de la contracture induite par l'association du CPA et d'halothane sur le muscle sensible et non sensible à l'HM est illustré par la figure 11. L'intensité des contractures induites par l'association du CPA et d'halothane sont représentés dans le tableau 3. Le CPA (10 μM) au terme de la période d'incubation (15-20 minutes) n'induit aucune contracture sur le muscle non sensible à l'HM. Cependant, après la

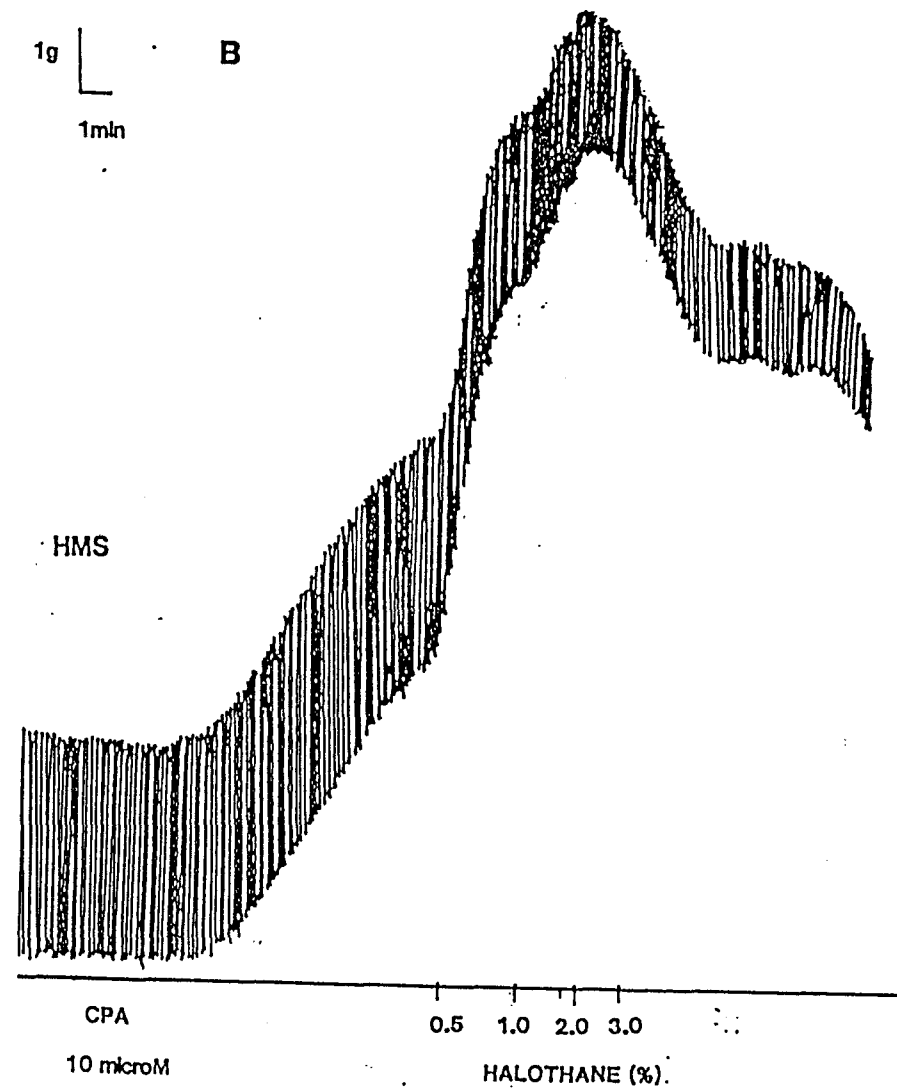
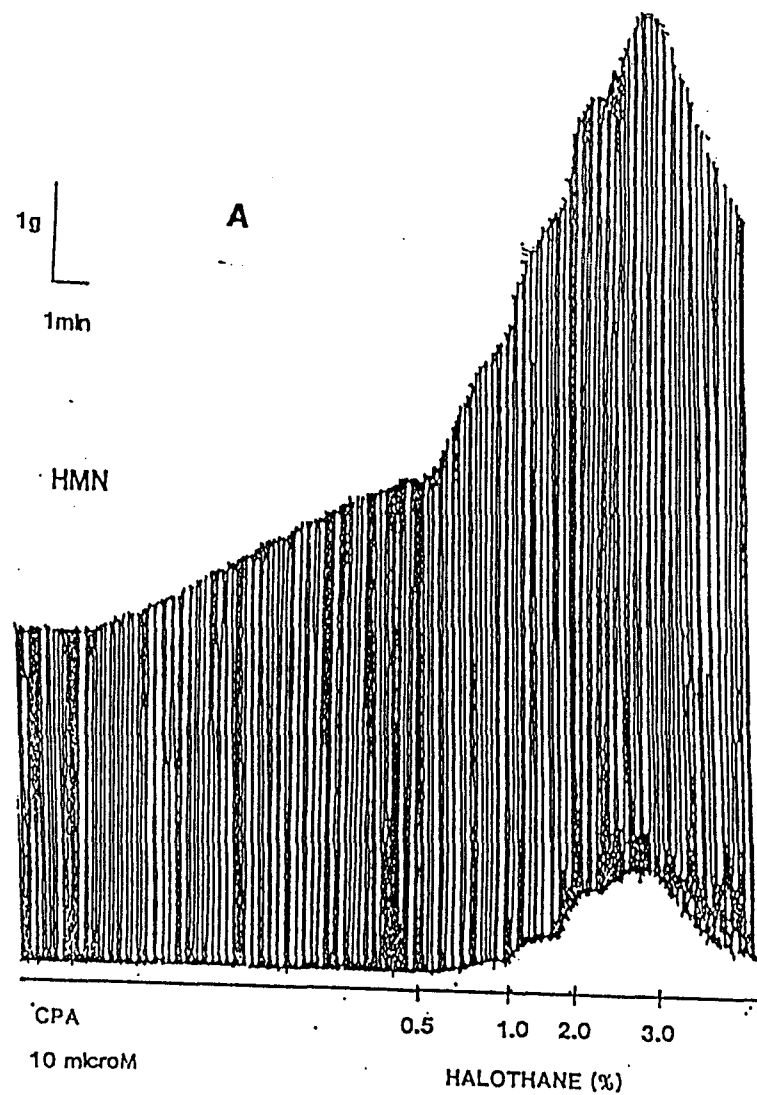


Figure 11 : Effet contracturant de l'association CPA-HALOTHANE sur le muscle non sensible à l'HM (A) et le muscle sensible à l'HM (B).

Tableau 3 : CONTRACTURES INDUITES PAR L'ASSOCIATION DU CPA ET D'HALOTHANE SUR LES MUSCLES SENSIBLES À L'HM ET SUR LES MUSCLES NORMAUX

		Contrôle	CPA 10 µM	HALOTHANE + CPA 10 µM			
				0.5 %	1 %	2 %	3 %
C (g)	HMN	0	0	0,13 ± 0,13	0,52 ± 0,33*	1,27 ± 0,60*	1,85 ± 0,73*
	HMS	0	0,37 ± 0,1	2,32 ± 1,6*§	3,42 ± 1,57*§	4,25 ± 1,25*§	7 ± 1,25*§

Moyenne ± SD; *p < 0.05 versus contrôle;

§ P < 0.05 : significativement différent entre HMN and HMS.

C : Contracture

période d'incubation, l'administration d'halothane induit des contractures dès les plus faibles concentrations d'halothane (0,5-1 vol % halothane).

A l'inverse sur les muscles sensibles à l'HM, le CPA seul induit une contracture au bout de 10 minutes. L'exposition à l'halothane potentialise considérablement la contracture et ceci dès la plus faible concentration d'halothane 0.5 vol %. Les contractures induites par l'association du CPA et de l'halothane sur les muscles sensibles à l'HM sont significativement plus importantes que celles observées sur les muscles normaux.

IV.2.2 EFFETS DU CPA SUR LE COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION.

Sur les muscles non sensibles à l'HM, le CPA seul à la concentration de 10 μ M augmente l'amplitude et la durée de la contraction (PT, TPT), sans modifier le pic positif de la dérivée de la tension isométrique (+dP/dtmax) (Tableau 4). Les paramètres de relaxations sont légèrement altérés comme l'attestent l'allongement du temps de demi-relaxation (RT1/2) et la diminution du pic négatif de la dérivée de la tension isométrique (-dP/dtmax). Sur les muscles sensibles à l'HM les paramètres de contraction et de relaxation ne sont pas significativement différents de leur valeur contrôle respective c'est-à-dire avant l'incubation au CPA .

Chez les sujets non sensibles à l'HM, l'administration de l'halothane combinée au CPA augmente significativement les paramètres de contractions (PT, TPT, +dP/dtmax ; $p < 0.05$) (tableau 4). Cet effet potentialisateur observé est inférieur à celui provoqué par l'halothane seul (cf article précédent Table 2). Par contre, l'originalité ici est que le TPT augmente cela peut expliquer une augmentation de PT (car le +dP/dtmax ne bouge pas). En revanche la phase de relaxation (RT 1/2, -dP/dtmax; $p < 0.05$) est significativement altérée.

Chez les sujets sensibles à l'HM, une légère diminution des paramètres de contraction est observée excepté le TPT qui s'allonge. En présence de forte concentration d'halothane (3 vol.%) les paramètres de contractions sont diminués (PT, +dP/dtmax; $p < 0.05$). En outre un effondrement très marqué de la phase de relaxation et ceci dès les plus faibles concentrations d'halothane est observé.

Tableau 4 : Effets des concentrations croissantes d'halothane sur les paramètres mécaniques du muscle squelettique humain sensible à l'hyperthermie maligne (HMS) et non sensible à l'hyperthermie maligne (HMN) après incubation dans l'acide cyclopiazonique (CPA).

		Contrôle	CPA 10 µM	HALOTHANE (vol %) + CPA 10 µM			
				0,5	1	2	3
PT (mN/cm ²)	HMN	664 ± 292	710 ± 326	806 ± 326*	901 ± 307*	917 ± 290*	876 ± 317*
	HMS	600 ± 28	615 ± 101	667 ± 155	613 ± 197	574 ± 227	519 ± 235
TPT (ms)	HMN	82 ± 9	99 ± 17*	108 ± 16*	116 ± 18*	117 ± 17*	120 ± 15*
	HMS	89 ± 6	96 ± 8	96 ± 9	96 ± 8	96 ± 8	95 ± 8
+dP/dtmax/cm ² (mN/s/cm ²)	HMN	11 422 ± 5 200	10 144 ± 4 920	11 374 ± 5 593	12 237 ± 4 969	12 643 ± 4 726	11 343 ± 4 551
	HMS	9 126 ± 801	9 187 ± 1 033	10 209 ± 1 720	9 385 ± 2 000	9 140 ± 3 268	8 206 ± 3 105
RT1/2 (ms)	HMN	66 ± 12	103 ± 19*	125 ± 25*	142 ± 31*	169 ± 36*	203 ± 54*
	HMS	98 ± 15	118 ± 21*	157 ± 45*§	183 ± 44*§	210 ± 47*§	263 ± 45*§
-dP/dtmax/cm ² (mN/s/cm ²)	HMN	6 482 ± 3 615	4 088 ± 1 378	4 035 ± 1 297*	3 972 ± 1 170*	3 472 ± 1 364*	2 750 ± 1 250*
	HMS	3 729 ± 1 103	3 497 ± 426	2 858 ± 879*§	2 302 ± 879*§	1 719 ± 721*§	1 382 ± 678*§
R	HMN	1,85 ± 0,35	2,37 ± 0,45	2,71 ± 0,70*	3,05 ± 0,75*	3,91 ± 1,40*	4,49 ± 1,67*
	HMS	2,55 ± 0,44	2,62 ± 0,07	3,81 ± 1,01*§	4,25 ± 0,73*§	5,44 ± 0,40*§	6,29 ± 0,93*§

Moyenne ± SD; *p < 0.05 versus contrôle;

§ P < 0.05: significativement différent entre HMN and HMS.

Le coefficient R est augmenté dans les deux groupes HMN et HMS. Cependant, l'augmentation du coefficient est significativement plus marquée dans le groupe HMS comparée au groupe HMN.

IV.2.3 CORRELATION ENTRE LA CONTRACTURE ET LES PARAMETRES MECANIQUES.

La relation entre la contracture et les paramètres de contraction-relaxation en présence de concentrations croissantes d'halothane en association avec le CPA a été étudiée. Dans le groupe HMN les paramètres de contraction ne sont pas corrélés avec la contracture (tableau 5). En revanche, RT 1/2 et le coefficient R sont linéairement corrélés avec le degré de contracture induite par chaque dose d'halothane. Il faut souligner l'absence de relation entre $-dP/dt_{max}$ et le niveau de contracture. Sur le muscle HMS, aucun paramètre de contraction n'est significativement corrélé avec la contracture (tableau 5). A l'inverse tous les paramètres de la relaxation sont significativement corrélés avec les contractures induites par l'halothane.

Sur le muscle normal, nous n'observons pas de corrélation entre le niveau de contracture et $-dP/dt_{max}$, contrairement à ce que nous observons sur les muscles sensibles à l'HM. L'absence de relation entre $-dP/dt_{max}$ et la contracture observée sur le muscle normal serait une donnée caractéristique des muscles non sensibles à l'HM. Les droites de régression et les coefficients de corrélations établis entre les paramètres de contraction et de relaxation (figures 12, et les tableaux 6 A-B), ont permis une étude approfondie de la phase de relaxation. L'analyse précise des paramètres de relaxation du muscle HM permet d'observer une modification qualitative de la phase de relaxation indépendante de la phase de contraction.

IV.2.4 DISCUSSION PARTIELLE.

Nos résultats montrent, qu'en présence de CPA, l'halothane provoque une contracture significative et une augmentation des paramètres de contraction (PT, TPT, $+dP/dt_{max}$) sur le muscle non sensible à l'HM. De plus l'effet inotrope positif observé sur le muscle non sensible est accompagné d'une augmentation du TPT. Sur le muscle non sensible, il est intéressant de

TABLEAU 5 : CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES MECANIQUES ET LA CONTRACTURE INDUITE PAR CHAQUE CONCENTRATION D'HALOTHANE.

Contracture vs.	HMN		HMS		CPA	
	CPA		HALOTHANE		CPA	
	r	p	r	p	r	p
PT (mN/cm ²)	0,67	0,21	0,20	0,73	0,69	0,19
TPT (ms)	0,72	0,16	0,50	0,38	0,64	0,24
+ dP/dtmax/cm ² (mN/s/cm ²)	0,20	0,74	0,47	0,42	0,60	0,27
RT 1/2 (ms)	0,92	0,02*	0,96	0,008*	0,99	0,0002*
- dP/dtmax/cm ² (mN/s/cm ²)	0,79	0,10	0,87	0,05*	0,96	0,007*
R	0,96	0,0007*	0,98	0,001*	0,98	0,003*

r = Coefficient de corrélation.

* p < 0,05 significativement corrélié.

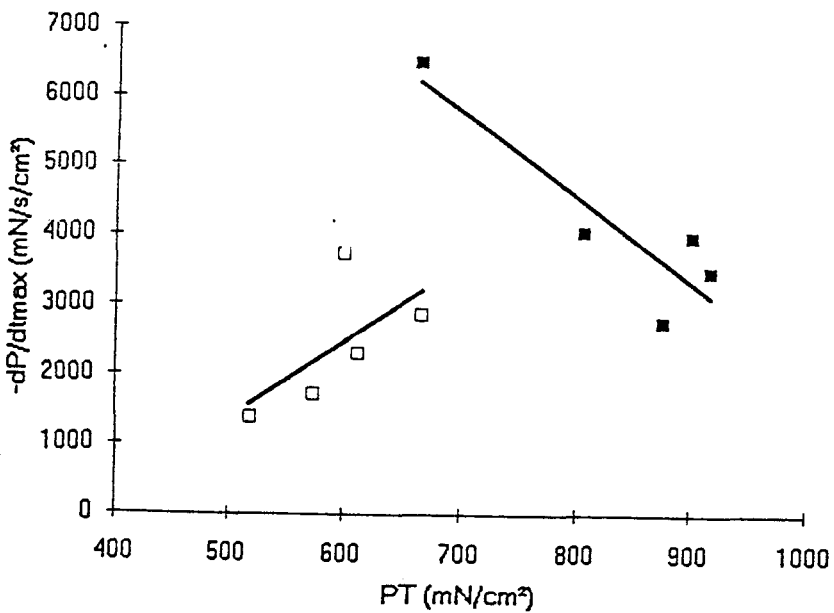
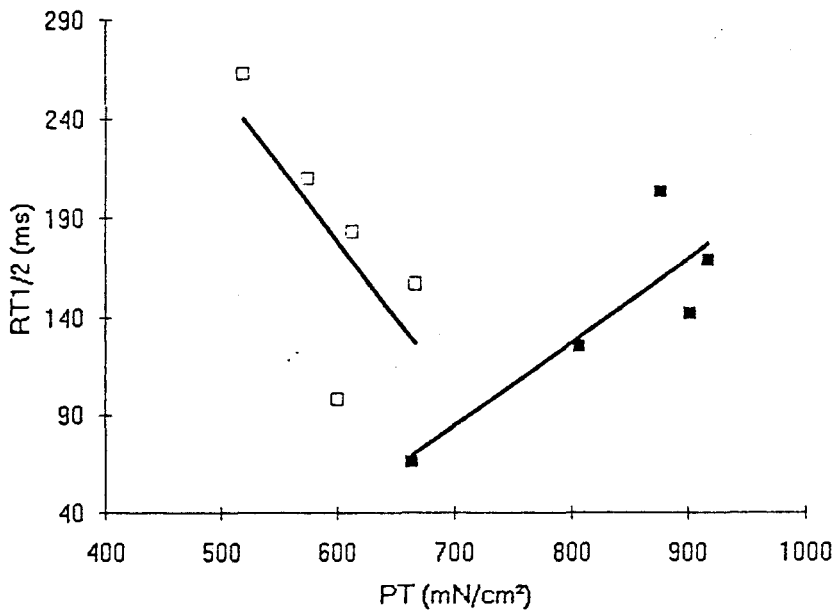


Figure 12 : (A): La relation entre PT versus RT1/2 en présence de concentrations croissantes d'halothane, (B): La relation entre PT versus -dP/dtmax en présence de concentrations croissantes d'halothane

Tableau 6A : Coefficients de corrélations obtenus à l'aide de droites de régression

PT	HMN		HMS	
	HALOTHANE	ACP	HALOTHANE	ACP
TPT	0.93*	0.93*	0.15	0.05
- dP/dtmax	0.98*	0.89*	0.61	0.64
RT1/2	- 0.05	0.85*	- 0.29	0.67

Relation entre PT et les paramètres suivants TPT, - dP/dtmax, RT1/2.

Tableau 6B : Coefficients de corrélations obtenus à l'aide de droites de régression

- dP/dtmax	HMN		HMS	
	HALOTHANE	CPA	HALOTHANE	CPA
RT1/2	0.002	0.92*	0.86*	0.98*

Relation linéaire entre - dP/dtmax et RT1/2.

noter un effet lusitrope négatif associé à un effet relaxant négatif. Sur le muscle sensible à l'HM, l'association du CPA et de l'halothane provoque très rapidement et de façon plus marquée une contracture associée à un effet inotrope et lusitrope négatif. Le mécanisme d'action du CPA a été bien établi par plusieurs auteurs (GOEGER et coll., 1989 ; SEIDLER et coll., 1989 ; KUREBAYASHI et coll., 1991). Le CPA est un inhibiteur spécifique de l'activité de la Ca^{2+} -ATPase du RS. La Ca^{2+} -ATPase est l'une des principales protéines du RS qui assure la régulation du cycle contraction-relaxation du muscle en transportant du calcium vers les sites de stockage du calcium localisés dans le RS. Une altération de la Ca^{2+} -ATPase modifie le couplage contraction-relaxation. Ceci se traduit dans nos résultats par une augmentation considérable de R. Nos résultats obtenus sur le muscle squelettique sensible et non sensible à l'HM sont compatibles avec une inhibition par le CPA du recaptage du calcium par la pompe Ca^{2+} -ATPase du SR. Ceci est illustré par une augmentation considérable du temps de demi-relaxation. Pour expliquer l'augmentation de l'amplitude et de la durée de la contraction, on peut invoquer un excès du calcium au niveau de l'appareil contractile conséquence d'une diminution de la capacité de repompage du calcium par le RS. Puis un effet lusitrope négatif attribuable à une diminution (ou à une inhibition sur les muscles sensibles à l'HM) de la cinétique de décroissance du calcium intramyoplasmique vers les sites de stockages calciques au niveau du RS.

L'ensemble des résultats obtenus sur lambeaux musculaires des sujets sensibles à l'HM met bien en évidence une atteinte des propriétés mécaniques intrinsèques du muscle sensible à l'HM, ainsi à l'effet inotrope négatif est associé un effet lusitrope négatif. L'altération de la fonction de recaptage du RS est bien établie par les résultats. L'effet relaxant négatif sur les muscles HM serait dû à l'induction de la contracture par l'halothane. En effet nos résultats montrent que, sur le muscle sensible à l'HM, la phase de relaxation est nettement plus affectée que la phase de contraction. L'effet relaxant négatif observé semble étroitement lié à une diminution considérable de la performance de la relaxation isométrique ($-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$). On peut dire que la cinétique de la phase de relaxation et le niveau de contracture sont étroitement liés.

L'ensemble de ces travaux souligne l'altération de la phase de relaxation et suggère une anomalie dans la fonction de recaptage du calcium par le RS du muscle sensible à l'HM. En outre

une altération de la libération du calcium par le RS du muscle sensible à l'HM a été rapportée par plusieurs auteurs (TAKAGI, 1976; ENDOH et coll., 1983; WILLIAMS et coll., 1991; ADNET et coll., 1991). POTREAU et RAYMOND (1982) ont montré l'existence d'une libération du calcium du RS par le mécanisme de "sodium-induced calcium release". Il était intéressant d'étudier l'influence de la modification de la perméabilité sarcolemmique au sodium sur les effets de l'halothane sur les muscles sensibles à l'HM. Cette idée a été confortée par les travaux de WIELAND et coll. 1989, qui trouvaient une anomalie dans le mécanisme d'inactivation des canaux sodiques sur des cultures de cellules musculaires de sujets sensibles à l'HM.

IV.3 INFLUENCE DE LA MODIFICATION DE LA PERMEABILITE SARCOLEMMIQUE AU SODIUM SUR LES EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LE COUPLAGE CONTRACTION-RELAXATION : EFFETS DE LA VERATRINE.

L'augmentation de la perméabilité sarcolemmique au sodium est obtenue en exposant les préparations à la vératrine, qui est un agoniste des canaux sodiques rapides du sarcolemme. Elle inhibe l'inactivation de ces canaux. Cela a pour conséquence une augmentation de la concentration sodique intramyoplasmique. En présence de cette augmentation de la perméabilité sodique, l'échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ extrude moins de calcium vers le milieu extracellulaire. Ceci provoque une augmentation du calcium intramyoplasmique d'où l'effet inotrope positif que l'on observe habituellement. En outre, les canaux sodiques semblent jouer un rôle important dans le mécanisme de la contraction puisque POTREAU et RAYMOND (1982) ont mis en évidence un mécanisme de libération du calcium réticulaire par une entrée du sodium.

Comme une anomalie dans les mécanismes d'activation-inactivation des canaux sodiques a été précédemment décrite dans l'hyperthermie maligne (WIELAND et coll., 1989), il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de la vératrine sur le couplage contraction-relaxation, afin

de mettre en évidence au niveau du sarcolemme une éventuelle modification de la perméabilité sodique du muscle sensible à l'HM comparé à celle du muscle non sensible à l'HM

Ce travail a donné lieu à un article en voie de soumission à la revue *Journal of Applied Physiol.* Nos résultats montrent que la vératrine seule n'induit pas de contracture, mais potentialise considérablement la contracture induite par l'halothane sur le muscle sensible à l'HM. Cet effet potentialisateur est maximal (1.60 ± 0.46 g) dès les plus faibles concentrations d'halothane (0.5 vol %). Sur les muscles non sensibles à l'HM, l'association de la vératrine et de l'halothane induit une contracture significative moins importante (0.35 ± 0.20 g) en présence seulement d'une forte concentration d'halothane (3 vol %).

Sur le muscle squelettique normal l'association de vératrine et d'halothane provoque une augmentation des paramètres de contraction (PT, +dP/dtmax) d'environ + 40 % sans modifier le TPT. La vitesse de relaxation (- dP/dtmax) est également augmentée (de l'ordre de + 40 %) et un prolongement du temps de demi-relaxation (RT1/2) d'environ 20 % est observé. Le rapport R reste inchangé. En revanche, sur les muscles sensibles à l'HM, l'association de vératrine et d'halothane provoque un effondrement des paramètres de contraction (PT, + dP/dtmax) et de relaxation (- dP/dtmax) de l'ordre de - 60 %, et un allongement considérable de RT1/2 d'environ + 90 %. Le rapport R est significativement augmenté.

La relation entre la contracture et les paramètres de contraction-relaxation en présence de concentrations croissantes d'halothane en association avec la vératrine a été étudiée. Sur les muscles sensibles à l'HM, les paramètres de contraction (PT, + dP/dtmax) et de relaxation (- dP/dtmax, RT1/2) sont significativement corrélés avec les contractures induites par l'association de vératrine et d'halothane. Sur les muscles non sensibles à l'HM, seuls les paramètres de relaxation (- dP/dtmax, RT1/2) sont corrélés avec les contractures induites par l'association de la vératrine et de l'halothane. Les paramètres de contraction ne sont pas corrélés avec les contractures induites par l'association de la vératrine et de l'halothane.

Sur les muscles non sensible à l'HM, la vératrine potentialise l'effet inotrope et lusitrope positif de l'halothane alors que sur les muscles sensibles à l'HM, l'association de vératrine et

**EFFECTS OF VERATRINE ON MECHANICAL RESPONSES
OF SKELETAL MUSCLE FROM PATIENTS SUSCEPTIBLE
TO MALIGNANT HYPERTHERMIA.**

TOUSSAINT S.· ETCHRIVI, PASCAL J. ADNET, GHISLAIN HAUDECOEUR,
HUGO G. REYFORD, AND RENEE M.KRIVOSIC-HORBER

Département d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale I, CHU de Lille and Departement de
Pharmacologie, Faculté de Médecine, 59037 LILLE Cédex France

Running title: Muscle relaxation and veratrine.

Address for correspondence:

Professeur PASCAL J. ADNET

Département d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale I, Hôpital B,

Centre Hospitalier Régional Universitaire, 59037 LILLE Cédex - France

Fax : 20-44-65-51

Tél : 20-44-62-69

ABSTRACT

The present study compared the effects of halothane and veratrine on mechanical responses and contracture of malignant hyperthermia (MH) and normal skeletal muscle under isometric condition. Muscle fiber bundles dissected from vastus lateralis muscle were mounted at optimal length in normal Ringer's solution. Parameters were measured prior to and during administration of halothane alone and in the presence of veratrine. Peak tension (PT) ; time to peak tension (TPT) ; positive peak of isometric tension derivative (+ dP/dtmax), were used to characterize inotropic state. Analysis of relaxation process was performed using half relaxation time (RT1/2) ; the negative peak of isometric tension derivative (- dP/dtmax). Ratio $R = (+ dP/dtmax) / (- dP/dtmax)$ was used to measure the coupling between contraction and relaxation under isometric condition. In normal muscle, both halothane and veratrine increased contraction parameters PT, + dP/dtmax by nearly 40 % without changing TPT. In the presence of veratrine, halothane extended RT1/2 by nearly 20 % and increased - dP/dtmax significantly. However the lack of modification of R was observed. In MH muscle, in the presence of veratrine, halothane induce a negative inotropic effect. RT1/2 increased with concomitant decrease in (- dP/dtmax), thus attesting the alteration of relaxation phase. R was significantly increased. In MH muscle, the halothane induced contracture was significantly enhanced in the presence of veratrine. Changes in contracture due to an increase in halothane concentration from 0.5 to 3 vol % halothane were significantly correlated with relaxation parameters and the ratio R in MH muscle. These results demonstrated that in MH muscle, in the presence of veratrine, halothane altered both contraction and relaxation parameters which were correlated with muscle contracture.

Index terms: Skeletal muscle ; muscle contraction ; muscle relaxation ; malignant hyperthermia ; muscle contracture.

INTRODUCTION

Malignant hyperthermia (MH) is initiated in predisposed human and animal by volatile anesthetics or depolarizing muscle relaxants such as succinylcholine (14). An MH episode can include muscle rigidity, hyperthermia, tachycardia, and metabolic acidosis (14). Currently the only recognized diagnostic test for MH susceptibility is the in vitro challenge of muscle fiber bundles with halothane and caffeine (11). In this diagnostic test, muscle from MH susceptible (MHS) individuals exhibits a lower threshold of contracture in response to halothane or caffeine than normal muscle.

Many experimental findings in human and porcine MH, have suggested that the regulation of skeletal muscle intracellular Ca^{2+} concentration is defective in the regulation of the Ca^{2+} release channel (1, 2, 30, 33). In addition, MH-susceptible muscle has been reported to show a halothane-induced depolarisation. Other non anesthetic-induced abnormalities, including abnormal electromechanical coupling (26), and alterations in several isolated organelles (7, 24, 25) have suggested a possible general membrane defect. Recent data have also shown that an increased magnitude of a slow inward current observed in cultured muscle cells from MH susceptible patients might be another manifestation of the lesion that causes MH. This slowly inactivating inward current component was carried by sodium. We therefore studied whether an increase membrane sodium permeability may influence the calcium release response of MH muscle to halothane. To this end, we used veratrine which is known to inhibit sodium channel inactivation and thus increases membrane sodium permeability in nerve (31) heart and skeletal muscle (15, 16, 18). The effects of veratrine were examined on halothane induced twitch potentiation and contracture in muscle bundles from patients susceptible to MH.

METHODS

In vitro contracture tests. Approval of the Lille University Human Studies Committee and informed consent were obtained from the patients for removing extra-muscle. Twenty-four patients were selected for diagnostic muscle biopsy based on suspicion of susceptibility to MH. Halothane and caffeine contracture tests were performed as previously described (1). The muscle used for the diagnostic test was the vastus lateralis. All patients were investigated according to the protocol supported by the European MH group (11). The criteria of MH susceptibility (MHS) were an increase in resting tension of at least 0.2 g both with a halothane threshold concentration $\leq 2\%$ (in the gas phase) and a caffeine threshold concentration ≤ 2 mM. A normal response (MHN) was defined as a halothane threshold ≥ 2 vol % and a caffeine threshold ≥ 2 mM. Other results (i.e. one abnormal response either with halothane or with caffeine) were classified MH-equivocal, but these patients were not included in this study since the significance of these results is not known. For diagnostic procedure, baseline and twitch tension were recorded at each dose for halothane.

SOLUTIONS. For all experiments, a Krebs-Ringer (KR) solution containing (in mM) 118.1 NaCl, 3.4 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.8 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, and 11.1 glucose was used. The pH was 7.35 ± 0.05 and the solution was bubbled with preheated 5 % carbon dioxide in oxygen. Stock of veratrine was prepared by dissolving in an ethyl alcohol solvent. Final concentration was obtained by single dilution with KR. Preliminary experiments showed that dilutions of ethyl alcohol from 1:10000 to 1:100 had no noticeable effects on resting or twitch tension. Halothane was administered by bubbling through the muscle bath from a calibrated vaporizer (Fluotec Mark III). The anesthetic concentration in the gas phase was monitored continuously with an infrared calibrated analyzer (Normac R, Datex). The anesthetic concentrations obtained in the KR solution were measured by gas-liquid chromatography (GLC) to determine the amount of anesthetic present in the test solution. A varian 1400 R gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a Porapack QR 3.17 mm by 150 cm column was used for

determination of anesthetic concentration. A 60 ml flask containing 100 μ l of the solution equilibrated 15 min with the anesthetic was maintained at 60°C (above the boiling point of each anesthetic) for 20 min before injection of gas into the apparatus, previously calibrated with known concentrations of the anesthetic (head space technique). The anesthetic concentrations measured in the experimental solutions of continuous bubbling were as follows ; 0.5 % : 0.09 ± 0.01 mM ; 1 % : 0.21 ± 0.01 mM ; 2 % : 0.37 ± 0.03 mM ; 3 % : 0.70 ± 0.05 mM.

Isolated muscle preparation. For experiments segments of muscle bundles (16-20 mm in length and 2-3 mm in diameter) were carefully dissected from the biopsies to insure that oxygen diffusion would be adequate at 37°C. As transected fibers were used for the study, predrug resting membrane potentials (RMP) were recorded in each muscle fiber bundle as previously described (1). All fiber segments tested (at least 15 per muscle bundle) had RMP ranging from - 80 and - 85 mV indicating no transection-induced significant depolarization of the fibers. Muscle bundles were then mounted in a temperature-controlled (37°C) muscle chamber (4 ml) which was perfused continuously (4-5 ml/min) with KR solution. One end was pinned to the silicone bottom of the muscle chamber, the other end of the muscle bundle was attached by a thin silk thread to a force transducer (Bioscience Dynamometer UFI and Biological Amplifier 120). The preparations were stimulated directly using silver electrodes with rectangular current pulses of 1-ms duration delivered at a frequency of 0.2 Hz by a stimulator CEA-DAM model GPI-GE2198. The optimal length was determined by increasing the voltage to supramaximal twitch tension and then increasing the length to achieve absolute twitch tension. After a stabilization period of 30 min., the experiments were performed at L_{max} , i.e., the initial length corresponding to the apex of the length-active tension curve. For diagnostic procedure, baseline and twitch tension were recorded continuously at low speed on a Siemens C1013. Isometric mecanograms were recorded on a Gould model type 4035 oscillographic recording system, equipped with a model carrier preamplifier and a model 120 high-gain preamplifier. The first derivative of developed tension dP/dt was obtained by an RC differentiator with a time constant of 2.5 ms.

Experimental recording. After dissection and mounting, muscles were allowed to equilibrate in KR for 30 min. Muscles were then exposed to veratrine (10 μ M) for 10 min. In order to characterize both MH and normal skeletal muscle performance during the isometric contraction and relaxation phases, classical mechanical parameters at L_{max} were measured. After the veratrine incubation period, incremental halothane concentrations of halothane (0.5-3 %) were added to the incubation media. After allowing for stabilization of the effect at each dose, records of tension and its first derivative with respect to time were obtained at high paper speed. Peak tension (PT), time to peak tension (TPT) and positive peak of isometric force derivative per cross-sectional area (CSA) ($+ dP/dt_{max}/cm^2$) ($mN/s/cm^2$) characterized the contraction phase (fig.1). Half-relaxation time (RT1/2) and negative peak of isometric force derivative per CSA ($- dP/dt_{max}/cm^2$) ($mN/s/cm^2$) were used to study the relaxation phase. As isometric relaxation rate depends on the isometric contraction rate, simultaneous variations of the two phases should be considered in order to quantify possible intrinsic changes in relaxation phase induced by halothane. Hence one additional parameter, R was measured : coefficient $R = (+ dP/dt_{max}) / (- dP/dt_{max})$ represented the ratio of peak force derivatives of the isometric twitch at L_{max} during the contraction and relaxation phases, respectively. This parameter has been validated as an index that tests the coupling between contraction and relaxation under isometric condition (8, 20).

Following the experiment each muscle strip was blotted dry and weighed and cross-sectional area (CSA) was calculated as muscle weight (g) / muscle length x 1.06. Peak force evoked by electrical stimulation is expressed as millinewton per centimeter squared.

Data are expressed as means \pm SE. After analysis of variance, the Student's unpaired t-test was used to compare mean values. Relationships between relaxation parameters and contracture were examined by least-squares linear regression. All comparisons were two tailed, and $p < 0.05$ was necessary to reach significance.

RESULTS

In vitro contracture test.

Muscle bundles from 12 patients developed a caffeine contracture of 0.4 ± 0.03 g at 2mM caffeine and a contracture of 0.90 ± 0.25 g at 2 % halothane. According to the protocol supported by the European MH group, these patients were classified as MH-susceptible. Twelve patients did not develop any significant contracture at the above concentration and were classified as MH non susceptible.

Typical individual and combined effects of veratrine and halothane on resting tensions are shown in fig.2.A-B, whereas mean values are shown in table 1. Veratrine did not induce muscle contracture on its own but considerably enhanced the halothane contracture of MH susceptible bundles. This effect occurred as soon as halothane was added to the carbogen flow and reached its maximal level 1.60 ± 0.46 g at the lowest concentration 0.5 vol % of halothane. This response was significantly higher than the (0.35 ± 0.15 g) obtained in the absence of veratrine. It was observed in 12 muscle preparations from 12 MH-susceptible patients. In contrast, in 12 MH non susceptible patients, no contracture was observed in the presence of combined 10 μ M veratrine and 0.5 vol % halothane whereas a significant contracture (0.23 ± 0.2 g) developed after increasing the concentration of halothane beyond 1 vol % in the presence of veratrine.

Mechanical properties in control conditions.

The twitch characteristics of the in vitro MH-susceptible and non-susceptible muscle bundles are shown in table 2-3. In the absence of either halothane or veratrine, PT, TPT and +dP/dtmax are comparable between groups of muscle bundles. When the relaxation phase of the two groups are compared, RT1/2 and - dP/dtmax did not distinguish MH susceptible from normal muscle. The calculated coefficient R was also not significantly different from that of normal muscle at the beginning of the experiment indicating that the coupling between contraction and relaxation under isometric condition was not different between groups of muscle in the absence of veratrine or halothane.

Effects of increasing concentrations of halothane.

Mean changes in PT, TPT, + dP/dtmax, RT1/2, - dP/dtmax and R are presented in table 2. In normal muscle, halothane increases PT by nearly 40 % (from 0.5 to 3 vol % halothane) without significantly altering TPT except at the highest concentration of halothane (3 vol %). Likewise RT1/2 was not significantly increased with concentrations of halothane. The + dP/dtmax increased concomitantly with the increase of the peak of tension decline (- dP/dtmax). Thus no change in coupling between contraction and relaxation under isometric condition was observed. In MHS muscle, exposure to increasing concentrations of halothane (0.5 - 1 vol %) first potentiated PT by only 10 % and depressed it (2 - 3 vol %). TPT and + dP/dtmax were not significantly altered whereas RT1/2 increased progressively with concomitant decrease in - dP/dtmax. Thus coefficient R increased significantly by nearly 45 % indicating that the relaxation phase was more affected by halothane than the contraction phase under isometric conditions.

Effects of increasing concentrations of halothane after incubation with veratrine.

Mechanical parameters are presented in table 3. Veratrine alone did not significantly change the twitch parameters both in normal and MH muscle. In normal muscle, when veratrine and halothane were administered together, the resulting potentiation of PT was nearly 40 % of that caused by halothane, again without significantly increasing TPT. The + dP/dtmax and RT1/2 increased concomitantly with the increase of - dP/dtmax. Thus no change in R was observed. In MH muscle, administration of halothane after exposure to veratrine induced a negative inotropic effect attested by a significantly decreased PT and + dP/dtmax. RT1/2 increased significantly from 0.5 to 3 vol % halothane with concomitant decrease in - dP/dtmax. Thus coefficient R increased by nearly 90 % indicating that the effects of combined veratrine and halothane were more pronounced in the relaxation phase.

Correlation-coefficient for contraction-relaxation parameters versus contracture in MH muscle at each concentration of halothane and veratrine plus halothane, are given in table 4. No correlation was found with halothane alone for parameters of the contraction phase (PT, TPT, + dP/dtmax), whereas there was a positive correlation for RT1/2, R and a negative correlation for - dP/dtmax. A positive correlation was found with veratrine alone only for RT1/2. The increase of muscle contracture with stepwise concentrations of halothane in the presence of veratrine was correlated with both contraction (PT, + dP/dtmax) and relaxation (- dP/dtmax, RT1/2) parameters and the ratio R.

DISCUSSION

That the isometric twitches of MHS and normal muscles respond differently to halothane were clearly demonstrated by this study and confirmed previous experimental reports (6, 12, 13). An unexpected finding was the unequivocally different response of the relaxation phase between MHS and normal muscle in the presence of combined veratrine and halothane. In MHS muscle, two parameters of the contraction phase and all parameters of the relaxation phase were consistently and reproducibly altered when exposed to increasing concentrations of halothane in the presence of 10 μ M veratrine. In contrast, normal muscle studied in an identical manner never demonstrated such responses. Hence halothane affects to a greater extent the relaxation phase than the contraction phase in human MH muscle compared to normal muscle and that prior administration of veratrine strongly potentiates this effect. In all MH muscle bundles tested, the negative lusitropic effect of veratrine-halothane was correlated with the magnitude of the contracture.

It is generally agreed that depolarization of the transverse tubular system triggers the release of Ca^{2+} from SR (30). This Ca^{2+} release is controlled either by sodium channels or calcium channels that also play the role of "voltage sensors". Two proposed mechanisms suggest that an electrical alteration induces a movement of voltage sensors and/or activates the sodium channels. The movement of these sensors and the open state sodium channels are the first steps in the Ca^{2+} release control mechanism (17, 19, 2, 28). Recently, it has been suggested that the dihydropyridine receptors, which also mediate the entrance of a very small current of extracellular Ca^{2+} into the muscle fiber (4, 2), acts as the voltage sensors controlling Ca^{2+} release from SR (calcium induced-calcium release mechanism). Likewise a similar mechanism has been described after activation of the Na^+ channel (Na^+ induced-calcium release mechanism) (28).

Our findings that veratrine and halothane in combination alter the contraction-relaxation coupling of MH muscle may be less related to the excitation-contraction coupling process per se than to the instability of these cut-fiber preparations, since cut-fiber specimens are prone to depolarization at least during the first hour after excision

(21). However, it has been demonstrated recently that such muscle cells may reseal with time and that these preparations may be far more physiologic than appreciated in the past (21). Consequently our result in MH-susceptible and normal muscle may be consistent with previous results suggesting the existence in MH susceptible muscle of an additional slowly inactivating inward current component carried by Na^+ (32). It is possible that the small and slowly activated current of extracellular Na^+ somehow may influence an abnormal prolonged activation of MH susceptible muscle induced by halothane. However it is important to note that the present results, as well as those of Wieland et al. (32) do not imply that halothane increases the sarcolemmal Na^+ current in MH susceptible muscle. Our results suggest that the Na^+ influx that is present somehow influences the contracture responses of MH susceptible muscle to halothane.

It is widely assumed that contraction of skeletal muscle depends essentially on intracellular storage of Ca^{2+} (2, 3, 22). Although no substantial data have suggested that binding of veratrine to the sodium channel alters E-C coupling, the drug does not affect muscle contractions under normal physiologic conditions (i.e. normal muscle). However, in abnormal conditions such as in our study (i.e., application of halothane on MH susceptible cut muscle bundles), veratrine did not significantly alter twitch parameters but consistently potentiated the halothane-induced contracture. This observation may indicate that these two different forms of E-C coupling probably are not mediated by a single process but are more likely mediated by different mechanisms.

Indeed, twitch tension represents a relatively fast muscle contraction, which may not be compatible with the low Na^+ conductance of a distinct but interconvertible form of Na^+ channel described in MH susceptible muscle (32). However, our results demonstrated the existence of a link between muscle relaxation and MH muscle contracture and the correlation is even greater in the presence of veratrine. Clearly, additional studies are needed to fully identify the main mechanism and the difference in the degree of effectiveness of other mechanisms involved. To this end, the effects of other components such as calcium antagonists, calcium agonist or free calcium solution,

compared to the effects of veratrine on MH muscle contracture, as demonstrated in the current study, may help towards a better understanding of halothane effects.

In summary, the experimental procedures altered the capacity of sodium channels to regulate the Ca^{2+} release channel of the SR. Consequently, the use of veratrine to bind to the Na^+ channel led more likely to the enhancement of the release of Ca^{2+} from SR. The role of Na^+ entry phenomena remains unclear, but the observed effects may suggest that extracellular Na^+ is required to reprime or to bind to some sites of the Na^+ channel. Thus, our results do suggest that modulation of the Na^+ channel can influence the Ca^{2+} release response of MH muscle to halothane.

This work was supported in part from the Association Française contre les Myopathies and from the Faculty of Medecine de Lille.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADNET, P.J., R.M. KRIVOSIC-HORBER, M.M. ADAMANTIDIS, G. HAUDECOEUR, H.G. REYFORD, AND B. DUPUIS. Is resting membrane potential a possible indicator of viability of muscle bundles used in the in vitro caffeine contracture test ? *Anaesth. Analg.* 74 : 105 - 111, 1992.
2. ADNET, P.J., R.M. KRIVOSIC-HORBER, M.M. ADAMANTIDIS, H.G. REYFORD, C. CORDONNIER, AND G. HAUDECOEUR. Effects of Calcium-free solution, calcium antagonists and the calcium agonist Bay K 8644 on mechanical responses of skeletal muscle from patients susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 75 : 413 - 419, 1991.
3. ARMSTRONG, C.M., F.M. BEZANILLA, AND P. HOROWICZ. Twitches in the presence of ethyleneglycol bis (B-aminoethyl ether)-N.N'-tetracetic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 267 : 605-608, 1972.
4. BRUM, G., E. STEFANI, AND E. RIOS. Simultaneous measurements of Ca⁺⁺ currents and intracellular Ca⁺⁺ concentrations in single skeletal fibres of the frog. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65 : 681-685, 1987.
5. BRUM, G., R. FITTS, G. PIZARRO, AND E. RIOS. Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *J. Physiol. (Lond.)* 398 : 475-505, 1988.
6. CAMPION, D.R., G. EIKELNBOOM, AND R.G. CASSENS. Isometric contractile properties of skeletal muscle from stress susceptible and stress resistant pigs. *J.Am.Sci.* 39 : 68-72, 1974.

7. CHEAH, K.S., AND A.M.CHEAH. Mitochondrial calcium transport and calcium activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. *Biochim. Biophys. Acta* . 634 : 70-84, 1981.
8. CHEMLA, D., Y. LECARPENTIER, J.L.MARTIN, M. CLERGUE, A. ANTONETTI, AND P.Y. HATT. Relationships between inotropy and relaxation in rat myocardium. *Am. J. Physiol.* 250 (*Heart Circ. Physiol.* 19) : H 1008- H 1016, 1986.
9. DEUSTER, P.A., E.L. BOCKAMAN, AND S.M. MULDOON. In vitro responses of cat skeletal muscle to halothane and caffeine. *J. Appl. Physiol.* 58 : 521-527, 1985.
10. ENDO, M., S. YAGI, T. ISHIZUKA, K. HORIUTI, Y. KOGA, AND K. AMAHA. Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia. *Biom. Res.* 4 : 83-92, 1983.
11. European Malignant Hyperpyrexia Group. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *British Journal of Anaesthesia.* 56, 1267-1269, 1984.
12. GALLANT, E.M., AND V.M. GOETTL. Porcine malignant hyperthermia: Halothane effects on force generation in skeletal muscles. *Muscle & Nerve.* 12 : 56-63, 1989.
13. GALLANT, E.M., R.E. GODT, AND G.A. GRONERT. Mechanical properties of normal and malignant hyperthermia susceptible porcine muscle : Effects of halothane and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213 : 91 - 96, 1980.

14. GRONERT, G.A. Malignant hyperthermia. *Anesthesiology*. 53 : 395-423, 1980.
15. HONERJÄGER, P., AND M. REITER. The relation between the effects of veratrine on action potential and contraction in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 289 : 1-28, 1975.
16. HORACKOVA, M. AND G. VASSORT. Ionic mechanism of inotropic effect of veratrine on frog heart. *Pflügers Arch.* 341: 281-284, 1973.
17. HOROWICZ P., AND SCHNEIDER M.F. Membrane charge movement in contracting and non-contracting skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314 : 565-593, 1981.
18. JEFFREY B. SUTRO. Kinetics of veratrine action on Na channels of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 87 : 1-24, 1986.
19. LAMB, G.D., AND D.G. STEPHENSON. Control of calcium release and the effect of ryanodine in skinned muscle fibres of the Toad. *J. Physiol. (Lond.)* 423 : 519-542, 1990.
20. LECARPENTIER, Y., D. CHEMLA, M. CLERGUE, AND J.L. MARTIN. Cardiac relaxation : Load sensitivity and sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 251 : H 1285 - H 1286, 1987.
21. LEHMANN-HORN, F., AND P.A. TAIZZO. Resealed fiber segments for the study of the pathophysiology of human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 13 : 222-231, 1990.

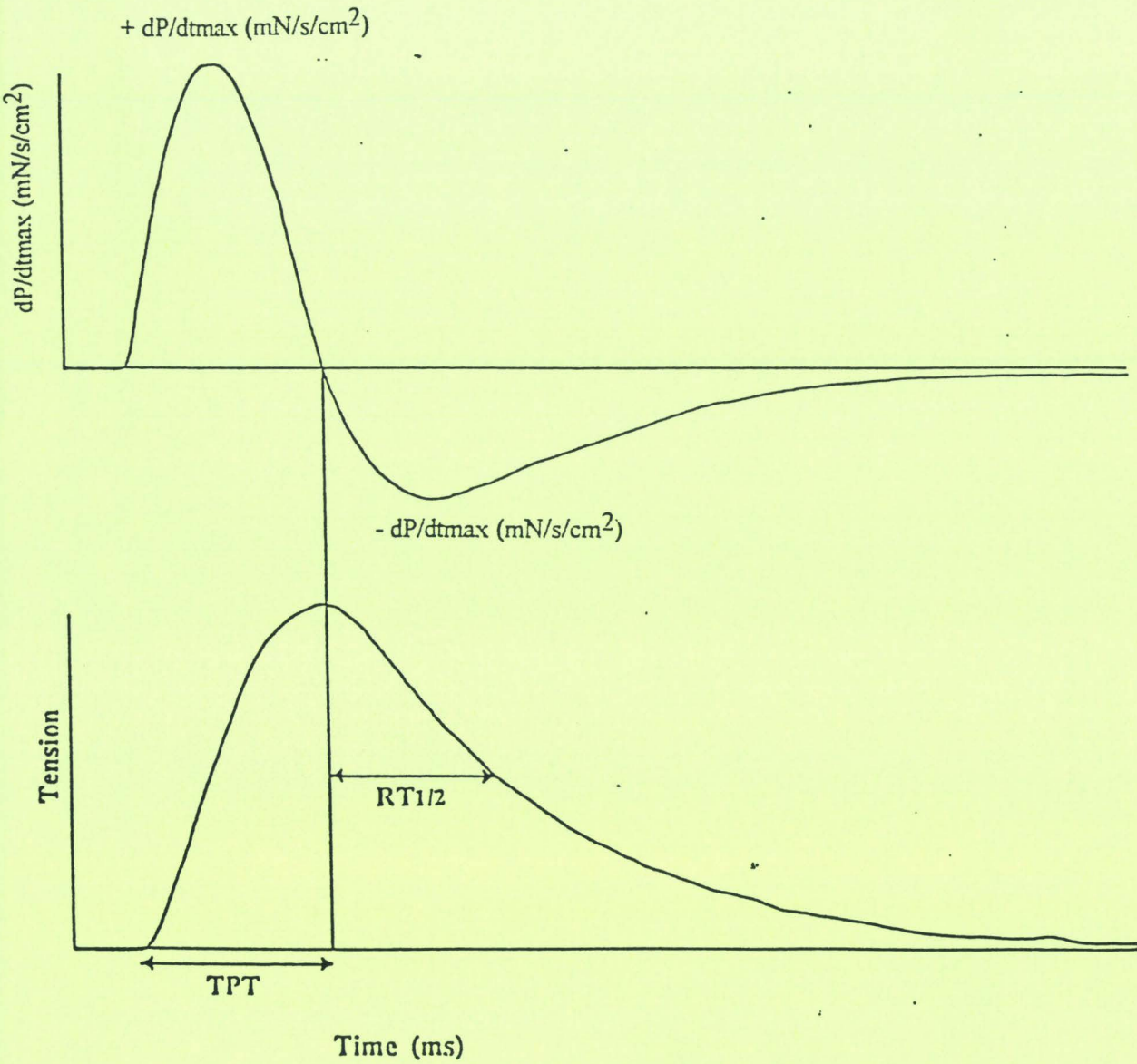
22. LUTTGAU, H.C., AND W. SPIECKER. The effects of calcium deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol. (Lond.)* 296 : 411-429, 1979.
23. MICKELSON, J.R., E.M. GALLANT, L.A. LITTERER, K.M. JOHNSON, W.E. REMPEL, AND C.F. LOUIS. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J. Biol. Chem.* 263 : 9310-9315, 1988.
24. MICKELSON, J.R., J.A. ROSS, B.K. REED, AND C.F. LOUIS. Enhanced Ca^{2+} -induced calcium release by isolated sarcoplasmic reticulum vesicles from malignant hyperthermia susceptible pig muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 862 : 318-328, 1986.
25. MICKELSON, J.R., J.A. ROSS, R.J. HYSLOP, E.M. GALLANT, AND C.F. LOUIS. Skeletal muscle sarcolemma in malignant hyperthermia : evidence for a defect in calcium regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 897 : 364-376, 1987.
26. NELSON, T.E., E.F. FLEWELLEN, AND D.W. ARNET. Prolonged electromechanical coupling time in skeletal muscle of pigs susceptible to malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 6: 263-268, 1983.
27. OHTA, T., M. ENDO, T. NAKANO, Y. MOROHOSHI, K. WANIKAWA, AND A. AHGA. Ca-induced Ca^{2+} release in malignant hyperthermia-susceptible pig skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256 (*Cell. Physiol.* 25) : C 358- C 367, 1989.
28. POTREAU, D., AND G. RAYMOND. Existence of a sodium-induced calcium release mechanism on frog single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 333 : 463-480, 1982.

29. SCHNEIDER, M.F., AND W.K. CHANDLER. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : a possible step in excitation coupling. *Nature* 242 : 244-246, 1973.
30. TAKAGI, A., H. SUGTA, Y. TOYOKURA, AND M. ENDO. Malignant hyperpyrexia : Effect of halothane on single skinned muscle Fibers. *Proc. Japan Acad.* 52 : 603-606, 1976.
31. ULBRICHT, W. The effect of veratrine on excitable membranes of nerve and muscle. *Ergebn. Physiol.* 61 : 18-71, 1969.
32. WIELAND, S.J., J.E. FLETCHER, H. ROSENGERG, AND QI-HUA GON. Malignant hyperthermia : slow sodium current in cultured human muscle cells. *Am. J. Physiol.* 257 : (*Cell. Physiol.* 26) : C 759- C 765, 1989.
33. WILLIAMS, J.H., M. HOLLAND, J.C. LEE, C.W. WARD, AND C.J. McGRATH. BAY K 8644 and nifedipine alter halothane but not caffeine contractures of malignant hyperthermic muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 261 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 30) : R 782- R 786, 1991.

LEGENDS

Fig. 1 : Example illustrating method used to obtain different mechanical parameters for normal and malignant hyperthermia susceptible muscle. TPT, time to peak tension ; RT1/2, half relaxation time ; dP/dt_{max} , peak of isometric force derivative (+ positive and - negative).

Fig.2 : Typical in vitro responses of malignant hyperthermia-susceptible muscle to increasing concentrations of halothane (A), in the presence of veratrine (B). Each concentration of halothane (0.5 to 3 vol %) was applied for 3 min, or in case of contracture, until a plateau was achieved. Preincubation with veratrine enhanced the response of halothane.



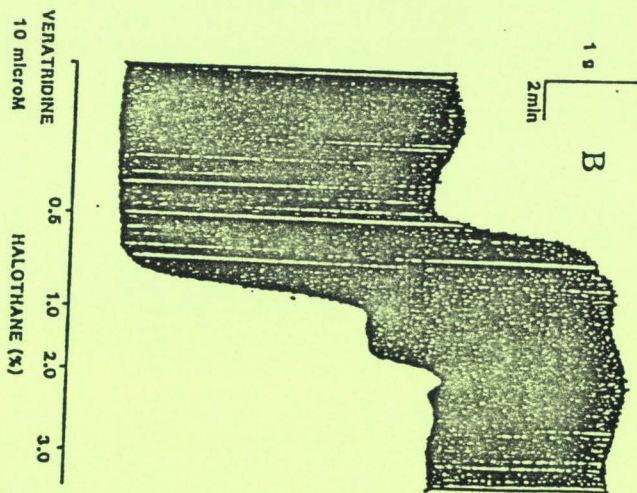
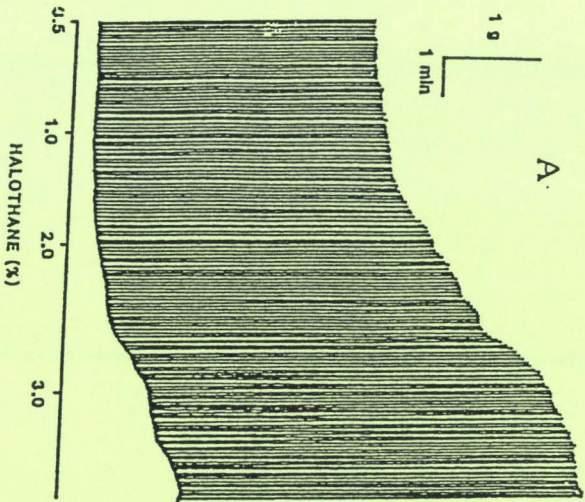


Fig 2

TABLE 1 : CONTRACTURE AMPLITUDES OF MUSCLES BUNDLES FROM PATIENTS SUSCEPTIBLE TO MALIGNANT HYPERTHERMIA IN RESPONSE TO 2 Vol % HALOTHANE AND 0.5 Vol % HALOTHANE IN THE PRESENCE OF VERATRINE.

MHS Patients	2 Vol % Halothane (g)	10 μ M veratrine + 0.5 Vol % Halothane (g)
1	0.6	0.6
2	0.9	1
3	0.5	0.5
4	0.6	0.5
5	0.6	0.8
6	1	0.7
7	0.4	1.9
8	1.8	1.3
9	0.2	0.6
10	0.4	1.5
11	3	1.7
12	0.8	2.8
Mean \pm SE	0.90 \pm 0.25	1.60 \pm 0.46

MSH : Malignant Hyperthermia-susceptible

TABLE 2 : INTRINSIC MECHANICAL PROPERTIES OF MUSCLE BUNDLES FROM 6 PATIENTS SUSCEPTIBLE TO MALIGNANT HYPERTHERMIA (MHS) AND 6 PATIENTS NON SUSCEPTIBLE TO MH (MHN) IN CONTROL CONDITION AND IN RESPONSE TO INCREASING CONCENTRATIONS

		CONTROL	0.5	1	2	3
PT (mN/cm ²)	MHN	258 ± 31	262 ± 30	290 ± 35*	338 ± 39*	371 ± 47*
	MHS	279 ± 27	324 ± 50	330 ± 55	296 ± 62	281 ± 67
TPT (ms)	MHN	73 ± 2	73 ± 2	77 ± 2	77 ± 2	80 ± 2
	MHS	76 ± 2	79 ± 3	77 ± 3	78 ± 3	79 ± 3
+ dP/dtmax/cm ² (mN/s/cm ²)	MHN	4 627 ± 504	4 800 ± 474	5 112 ± 495*	5 626 ± 506*	6005 ± 679*
	MHS	5 193 ± 570	5 666 ± 787	6 308 ± 1161	4 680 ± 386	4 827 ± 1252
RT1/2 (ms)	MHN	76 ± 4	82 ± 4	79 ± 5	78 ± 6	79 ± 6
	MHS	72 ± 7	79 ± 3	91 ± 4*	103 ± 7*+	122 ± 5*§
- dP/dtmax/cm ² (mN/s/cm ²)	MHN	2 284 ± 384	2 306 ± 379	2 685 ± 441	2 895 ± 430*	3 256 ± 578*
	MHS	2 518 ± 697	2 835 ± 876	2 488 ± 678	1 977 ± 533*+	1 416 ± 355*+
R	MHN	2.02 ± 0.13	2.1 ± 0.1	1.98 ± 0.14	2.02 ± 0.14	1.98 ± 0.15
	MHS	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.96 ± 0.2*+	3.2 ± 0.02*+

Values are mean ± ES ; * p < 0.05 versus control ;

+ p < 0.05 : significantly different between MHN and MHS.

TABLE 3 : INTRINSIC MECHANICAL PROPERTIES OF MUSCLE BUNDLES FROM 6 PATIENTS SUSCEPTIBLE TO MALIGNANT HYPERTHERMIA (MHS) AND 6 PATIENTS NON SUSCEPTIBLE TO MH (MHN) IN CONTROL CONDITION AND IN RESPONSE TO INCREASING CONCENTRATIONS OF HALOTHANE (0.5 TO 3 %) AFTER 10 min. INCUBATION WITH VERATRINE

		CONTROL	Tmax	0.5	1	2	3
PT (mN/cm2)	MHN	269 ± 36	320 ± 60	337 ± 73*	364 ± 72*	394 ± 71*	390 ± 73*
	MHS	251 ± 55	222 ± 48	183 ± 50*+	139 ± 42*+	107 ± 40*+	86 ± 38*+
TPT (ms)	MHN	75 ± 5	80 ± 9	82 ± 9	82 ± 9	84 ± 12	87 ± 13
	MHS	75 ± 3	73 ± 4	76 ± 4	74 ± 4	75 ± 4	73 ± 4
+ dP/dtmax/cm2 (mN/s/cm2)	MHN	4 937 ± 427	5 486 ± 396	5 273 ± 510	5 990 ± 479*	6 304 ± 286*	5 925 ± 334*
	MHS	5 015 ± 1 231	4 377 ± 1 033	3 439 ± 832*	3 034 ± 857*+	2 090 ± 726*+	1 701 ± 726*+
RT1/2 (ms)	MHN	71 ± 7	79 ± 6	74 ± 8	79 ± 10	79 ± 10	88 ± 10*
	MHS	66 ± 3	97 ± 8	110 ± 8*+	105 ± 6*+	111 ± 18*+	136 ± 24*+
- dP/dtmax/cm2 (mN/s/cm2)	MHN	2 468 ± 194	2 677 ± 378	2 796 ± 490	3 124 ± 389	3 054 ± 295	2 614 ± 356
	MHS	2 370 ± 494	1 669 ± 355*	1 103 ± 268*+	816 ± 237*+	568 ± 191*+	423 ± 163*+
R	MHN	2.01 ± 0.13	2.14 ± 0.16	2.0 ± 0.2	1.96 ± 0.1	2.11 ± 0.13	2.3 ± 0.2
	MHS	2.06 ± 0.14	2.61 ± 0.2	3.16 ± 0.26*	3.65 ± 0.23*+	3.6 ± 0.2*+	3.8 ± 0.4*+

Values are mean ± ES ; * p < 0.05 versus control

+ p < 0.05 : significantly different between MHN and MHS.

Tmax : 10 min. after incubation of veratrine

TABLE 4 : CORRELATION COEFFICIENT FOR HALOTHANE-INDUCED CONTRACTURE AND CONTRACTION-RELAXATION PARAMETERS OF MALIGNANT HYPERTHERMIA SUSCEPTIBLE MUSLES IN RESPONSES TO INCREASED CONCENTRATION OF HALOTHANE (0.5-3 %) IN THE ABSENCE AND IN THE PRESENCE OF VERATRINE

COVARIATE	N° OF MUSCLE BUNDLES	PT	TPT	+ dP/dt max/cm2	RT 1/2	- dP/dt max/cm2	R
Halothane-alone	6	0.02	0.50	0.47	0.96**	0.87*	0.98**
Halothane-veratrine	6	0.99**	0.59	0.99**	0.92*	0.95*	0.93*

* p < 0.05 ; ** p < 0.001

d'halothane altère considérablement les paramètres d'inotropisme et de lusitropisme. Cet effet lusitrope négatif est en outre associé à un effet relaxant négatif (augmentation du rapport R), ce qui témoigne de l'altération des propriétés mécaniques intrinsèques du muscle squelettique sensible à l'HM. Ces résultats vont dans le sens d'une anomalie de la perméabilité aux ions sodium et peuvent s'interpréter comme une conséquence de l'altération de l'inactivation des canaux sodiques. Ceci pourrait être vérifié en étudiant plus précisément le fonctionnement des canaux sodiques par des techniques électrophysiologiques de mesure du courant sodique.

IV.4 ETUDE DE LA REACTIVITE A L'HALOTHANE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE SELON LE TYPE DE FIBRE MUSCULAIRE.

Les lambeaux musculaires de sujets sensibles à l'HM montrent une grande réactivité à la contracture induite par l'halothane. Une anomalie des canaux calciques de relargage du RS serait impliquée dans la pathologie de l'HM (ENDOHO et coll., 1983; OHNISHI et coll., 1989 ; NELSON, 1992). Nous avons utilisé le modèle de la fibre pelée pour : (1) apprécier l'influence de l'halothane sur la libération du calcium par le RS ; (2) rechercher si la libération du calcium est dépendante des fibres de type I ou II ; (3) comparer le seuil de réactivité à l'halothane de sujets sensibles à l'HM à celui de sujets non sensibles.

IV.4.1 CARACTERISTIQUES PHYSIQUES.

L'étude de la réactivité à l'halothane de fibres musculaires a été réalisée sur 99 fibres de sujets HMS et de 106 fibres de sujets HMN. Les caractéristiques des fibres sont représentées dans le tableau 7. Le diamètre n'est pas significativement différent entre les fibres HMS type I ($79 \pm 15 \mu\text{M}$), HMS type II ($74 \pm 6 \mu\text{M}$), et les fibres HMN type I ($79 \pm 15 \mu\text{M}$), et HMN type II ($68 \pm 18 \mu\text{M}$). La longueur moyenne de ces fibres est d'environ $1600 \pm 200 \mu\text{M}$.

La tension maximale isométrique développée par la solution activatrice de pCa 4.8 n'est pas significativement différente dans le groupe HMS pour les fibres de type I et II respectivement

$35 \pm 17 \text{ N.cm}^{-2}$ et $33 \pm 14 \text{ N.cm}^{-2}$; dans le groupe HMN, les fibres de type I et II développent respectivement $33 \pm 17 \text{ N.cm}^{-2}$ et $32 \pm 15 \text{ N.cm}^{-2}$.

IV.4.2 SEUIL DE REACTIVITE A L'HALOTHANE DES FIBRES PELEES

Nous avons pris en compte toute fibre développant une contracture supérieure à 10 % de la contracture induite par pCa 4.8 pour une concentration donnée d'halothane. La figure 13 montre un tracé représentatif de fibres de sujets sensibles à l'HM et de fibres de sujets non sensibles. Après avoir chargé le RS par la solution de charge (pCa 6.8), la fibre est exposée à une concentration d'halothane donnée. Le degré de contracture induite par l'halothane est le reflet de la quantité de calcium libérée par le RS. Les fibres de sujets sensibles à l'HM développent une contracture en présence d'une faible concentration d'halothane, alors que l'induction de la contracture sur les fibres non sensibles à l'HM nécessite une forte concentration d'halothane.

La figure 14 montre le seuil de contracture à l'halothane pour chaque fibre étudiée chez les sujets non sensibles et sensibles à l'HM. Les moyennes des seuils de contractures sont données dans le tableau 8. Dans le groupe de sujets sensibles à l'HM, les seuils de contracture ne sont pas significativement différents entre les fibres de type I et les fibres de type II. Chez les sujets non sensibles à l'HM, aucune différence entre les fibres de type I et les fibres de type II n'a été observée. Cependant, les fibres de type I et de type II des sujets sensibles à l'HM ont un seuil de contracture plus bas que les fibres de type I et de type II des sujets non sensibles à l'HM.

IV.4.3 DISCUSSION PARTIELLE

Notre étude met en évidence un effet direct de l'halothane sur la libération du calcium par le RS. Ces résultats montrent que les fibres de type I et II des sujets sensibles à l'HM présentent une grande réactivité à l'halothane comparée à celles des fibres de type I et II des sujets non sensibles. Chez les sujets sensibles comme chez les sujets non sensibles, la réactivité des fibres de type I ne diffère pas de celle des fibres de type II. Sur les fibres sensibles à l'HM, l'halothane active la libération du calcium par le RS. Sur les porcs sensibles à l'HM, certains auteurs (ENDOY et coll., 1983 ; OHNISHI et coll., 1983 ; OHTA et coll., 1989) ont mis en évidence une importante augmentation /ou accélération du mécanisme de "calcium-induced calcium

TABLEAU 7 : Caractéristiques physiques des fibres musculaires HMS et HMN.

	HMS (n = 99)		HMN (n = 106)	
	I	II	I	II
Diamètre (μm)	79 \pm 15	74 \pm 6	79 \pm 15	68 \pm 18
Longueur (μm)	1 600 \pm 200	1 600 \pm 200	1 600 \pm 200	1 600 \pm 200
Tmax (N.cm ²)	35 \pm 17	33 \pm 14	33 \pm 17	32 \pm 15

n = nombre de fibres musculaires

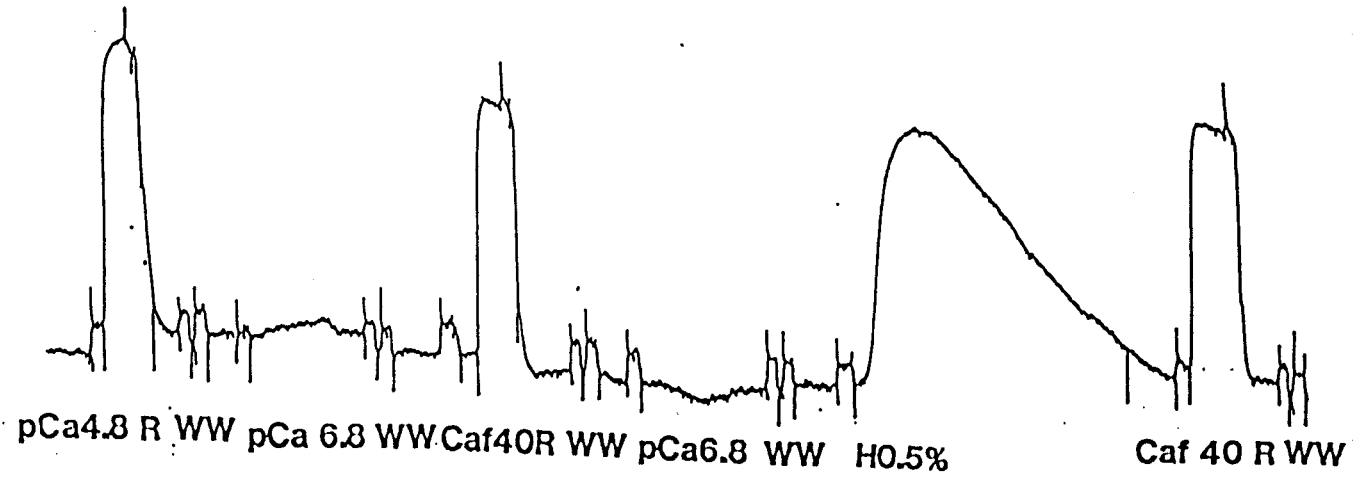
Tmax : Tension maximale isométrique

Valeurs données en moyenne (\pm ESM)

HMS : fibres musculaires de sujets sensibles à l'HM

HMN : fibres musculaires de sujets non sensibles à l'HM

A



B

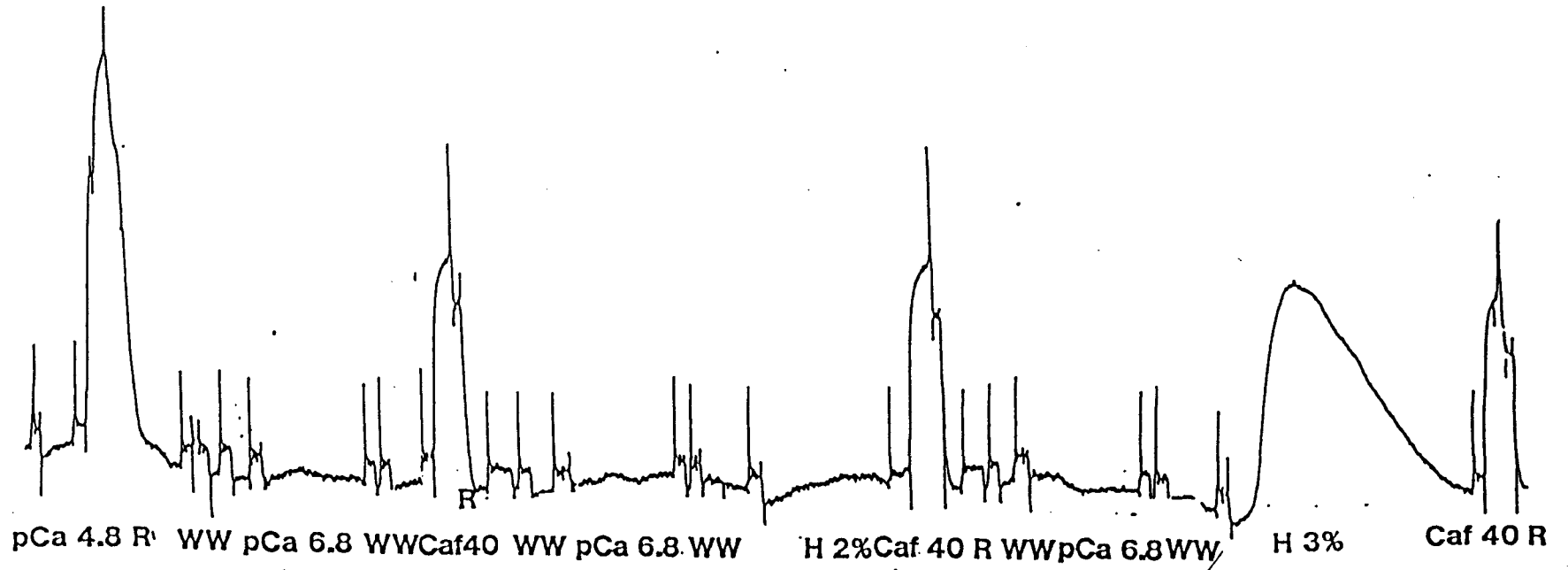


Figure 13 : Exemple de tracés montrant la réactivité à l'halothane de fibre pelée de sujets sensibles à l'HM (A), et de fibre pelée de sujets non sensibles à l'HM (B).
 R= solution relax; W= solution wash; Caf 40= solution dont la concentration en caféine est de 40 mM; H x%= solution wash contenant x vol % d'halothane.

■ type I - HMN : n 44

□ type II - HMN . n 62

CONCENTRATION SEUIL D'HALOTHANE (VOL %)

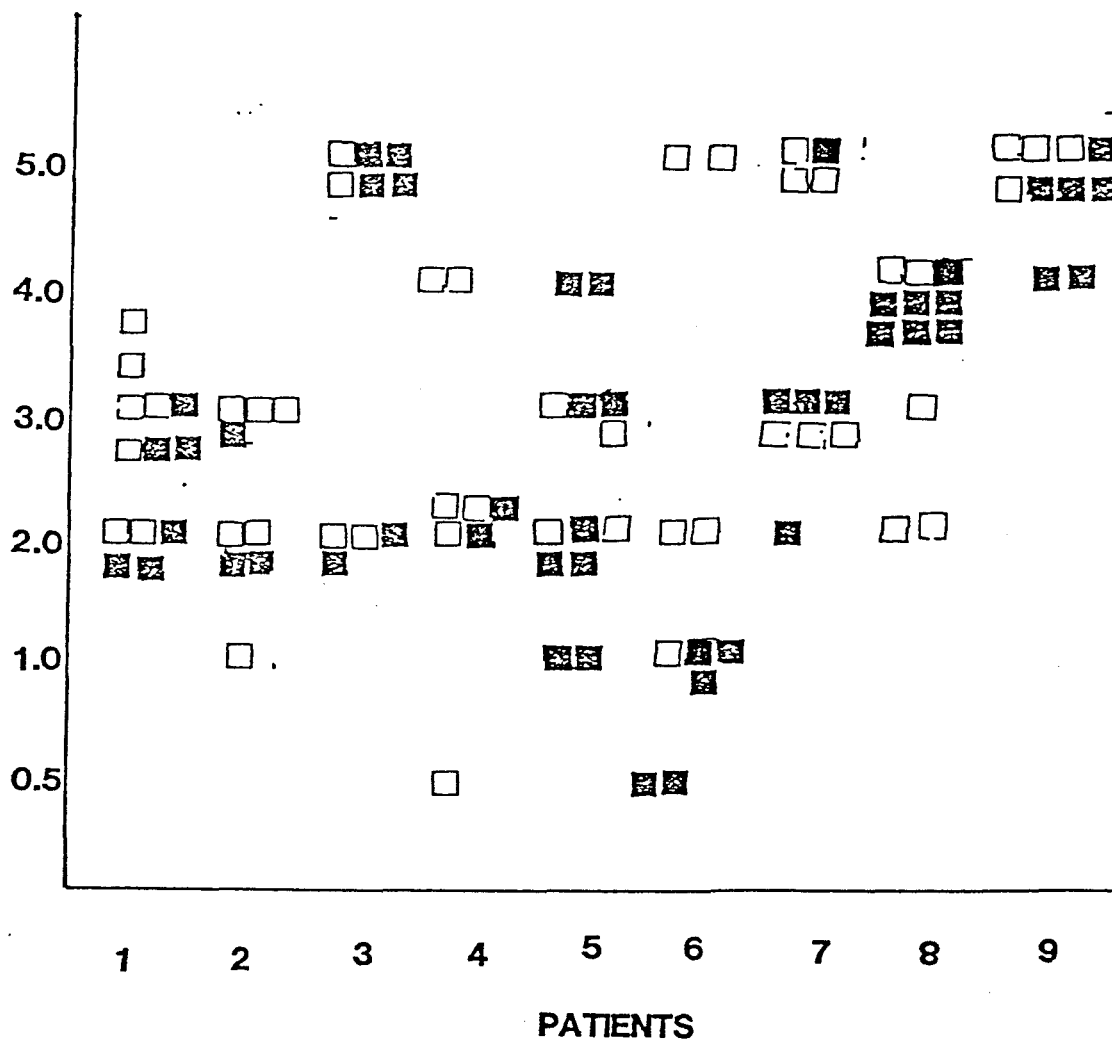


Figure 14 A : Seuil de contracture à l'halothane chez 9 patients HMN. Le seuil de contracture à l'halothane est identifié pour chaque fibre étudiée chez un patient par un carré plein (■) pour les fibres de type I et par un carré vide (□) pour les fibres de type II.

CONCENTRATION SEUIL D'HALOTHANE (VOL %)

● type I - HMS : n 56

○ type II - HMS : n 43

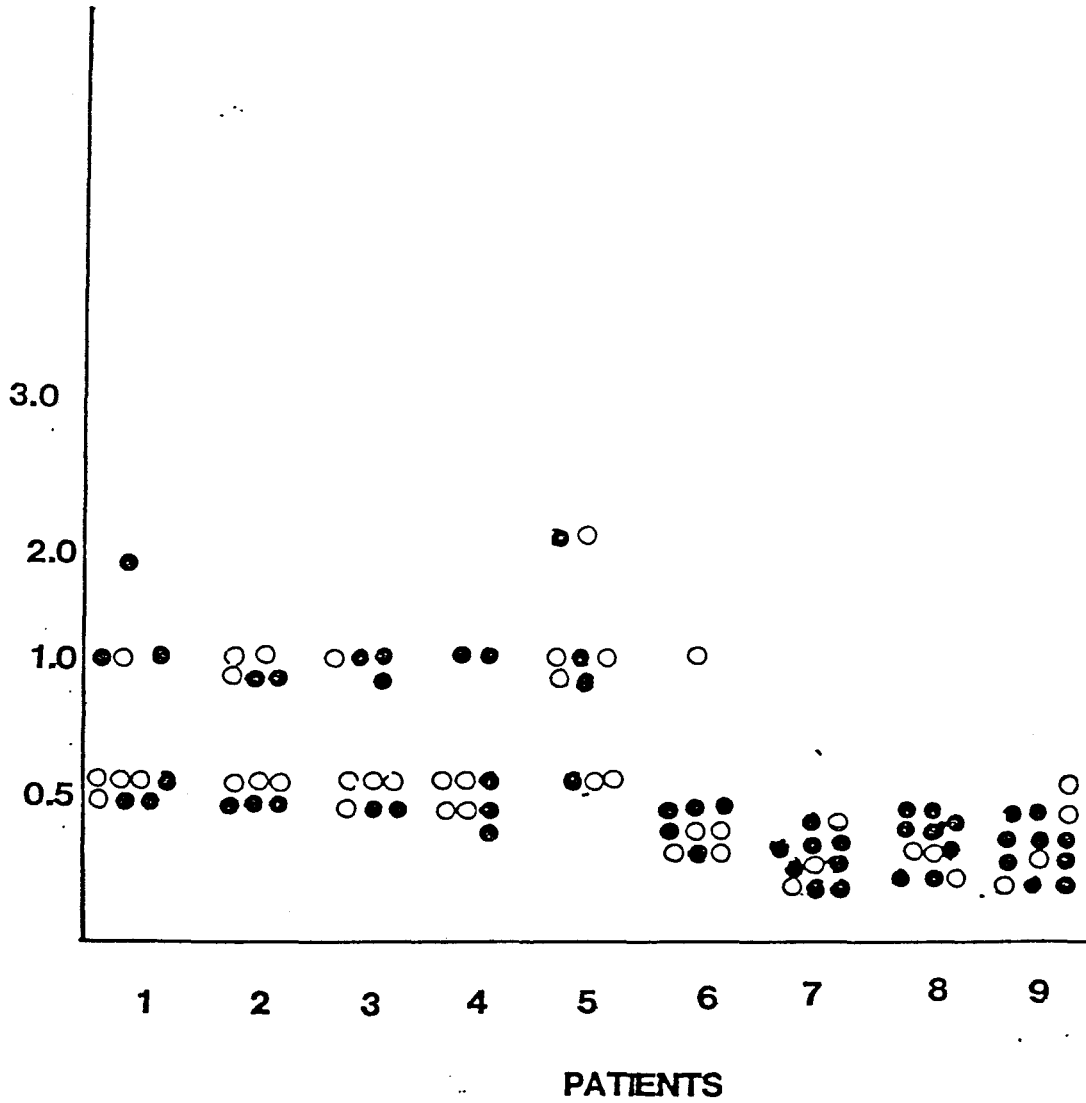


Figure 14 B : Seuil de contracture à l'halothane chez 9 patients HMS. Le seuil de contracture à l'halothane est identifié pour chaque fibre étudiée chez un patient par un rond plein (●) pour les fibres de type I et par un rond vide (○) pour les fibres de type II.

TABLEAU 8 : REACTIVITE A L'HALOTHANE DEPENDANTE DU TYPE DE FIBRE MUSCULAIRE

TYPE DE FIBRE	HMS (%)	HMN (%)
I	0,79 ± 0,06	2,71 ± 0,18*
II	1,05 ± 0,10	2,45 ± 0,16*

Réactivité à l'halothane dépendante du type de fibre musculaire. Valeurs données en moyenne (± ESM) du seuil de réactivité à l'halothane (vol %).

HMS : sensible , HMN : non sensible ; * p < 0.05 comparé à la valeur correspondante dans le groupe HMS.

release". Selon ces auteurs l'hypersensibilité du mécanisme de "calcium-induced calcium release" observée sur les fibres des porcs sensibles à l'HM, pourrait être attribuée à une altération du mécanisme de régulation de la libération du calcium. Contrairement à nos résultats, ces auteurs n'ont pas retrouvé une différence significative de l'effet de l'halothane sur la libération du calcium par le RS entre les fibres de porcs sensibles à l'HM et de porcs non sensibles.

Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués en partie par des méthodes de pelage et de conservation différentes, des modalités d'administration de l'halogène non standardisées. En effet, l'étape la plus délicate de l'expérimentation est de s'assurer que la solubilisation de l'halothane est correctement réalisée. Dans notre méthode, il a été vérifié que 20 min. de barbotage de l'halothane dans la solution de wash sont nécessaires pour obtenir l'état d'équilibre.

Sur des vésicules isolées de RS, certains auteurs ont montré que la libération du calcium est médiée par les canaux calciques (SMITH et coll., 1989). De plus, la vitesse de libération du calcium dépend de la concentration du calcium contenue ou stockée par le RS (MEISSNER, 1984 ; OHTA et coll., 1989). Ainsi, sur les fibres de sujets sensibles à l'HM, nos résultats montrent que l'halothane généralement à plus faible concentration active le mécanisme de la libération du calcium par le RS. De nombreuses études ont démontré que la libération du calcium par le RS s'intègre dans un mécanisme de couplage excitation-contraction, dont la région charnière est une triade formée par le système tubulaire transverse et deux renflements du RS. Le canal réticulaire responsable de la libération de calcium fixe spécifiquement la ryanodine (MEISSNER, 1986 ; BLOCK et coll., 1988). Ce récepteur à la ryanodine serait physiquement juxtaposé à un récepteur sensible aux 1-4 dihydropyridines (DHP) situé dans la membrane du tubule transverse, qui joue le rôle de voltage sensor et régule ainsi la libération de calcium à partir du canal réticulaire (RIOS et coll., 1987,1991 ; BLOCK et coll., 1988 ; ADNET et coll., 1991).

Sur le muscle entier, l'activation du mécanisme de libération du calcium par l'halothane peut conduire à une libération autocatalytique du calcium qui excède les possibilités du recaptage par la pompe Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase dépendante. L'effet activateur de l'halothane sur la libération du calcium par le RS, retrouvé dans notre étude, explique en partie la contracture induite secondairement par la surcharge calcique intramyoplasmique observée sur les lambeaux musculaires des sujets sensibles à l'HM. En outre, une hypersensibilité à l'halothane du

mécanisme de libération du calcium par le RS des fibres sensibles à l'HM suggère une anomalie des mécanismes impliqués dans la libération du calcium au niveau du RS. Toutefois une meilleure compréhension de l'HM nécessite d'autres travaux sur l'implication possible des myofilaments.

IV.5. SENSIBILITE AU CALCIUM DES PROTEINES CONTRACTILES

IV.5.1. INFLUENCE DE L'HALOTHANE SUR LA REACTIVITE CALCIQUE DES PROTEINES CONTRACTILES.

Les courbes Tension - pCa des fibres pelées squelettiques ont été réalisées à partir de biopsies musculaires effectuées chez les patients non sensibles. L'effet de l'halothane sur la sensibilité au calcium du muscle squelettique dépend du type de fibre. La figure 15 représente un exemple de courbe Tension - pCa de fibre pelée squelettique de type I en condition contrôle et en présence d'halothane à MAC 1. La courbe Tension - pCa normalisée est déplacée de façon significative ($p < 0.05$) vers la droite en présence d'halothane (MAC 1 et MAC 3) pour les fibres de type I (figure 16). Comme l'indique le tableau 9, les pCa 50 obtenues à MAC 1 et 3 correspondent respectivement à 5.78 ± 0.04 et 5.70 ± 0.05 . Le déplacement vers la droite est plus marqué en présence de MAC 3. La diminution de la sensibilité au calcium des protéines contractiles de fibres squelettiques de type I est réversible et n'est pas dépendante de la concentration d'halothane. Le coefficient de Hill n'est pas modifié de manière significative par l'halothane .

La figure 17 montre un exemple de l'étude de la sensibilité au calcium d'une fibre squelettique de type II en l'absence et en présence d'halothane. La courbe Tension - pCa normalisée des fibres de type II n'est pas significativement modifiée par l'halothane (MAC 1 et MAC 3) (figure 18). Il n'existe pas de différence significative de la pCa 50 et du coefficient de Hill pour les fibres de type II en présence ou non d'halothane (tableau 9). La sensibilité au calcium des protéines contractiles des fibres squelettiques de type II n'est pas modifiée par l'halothane.

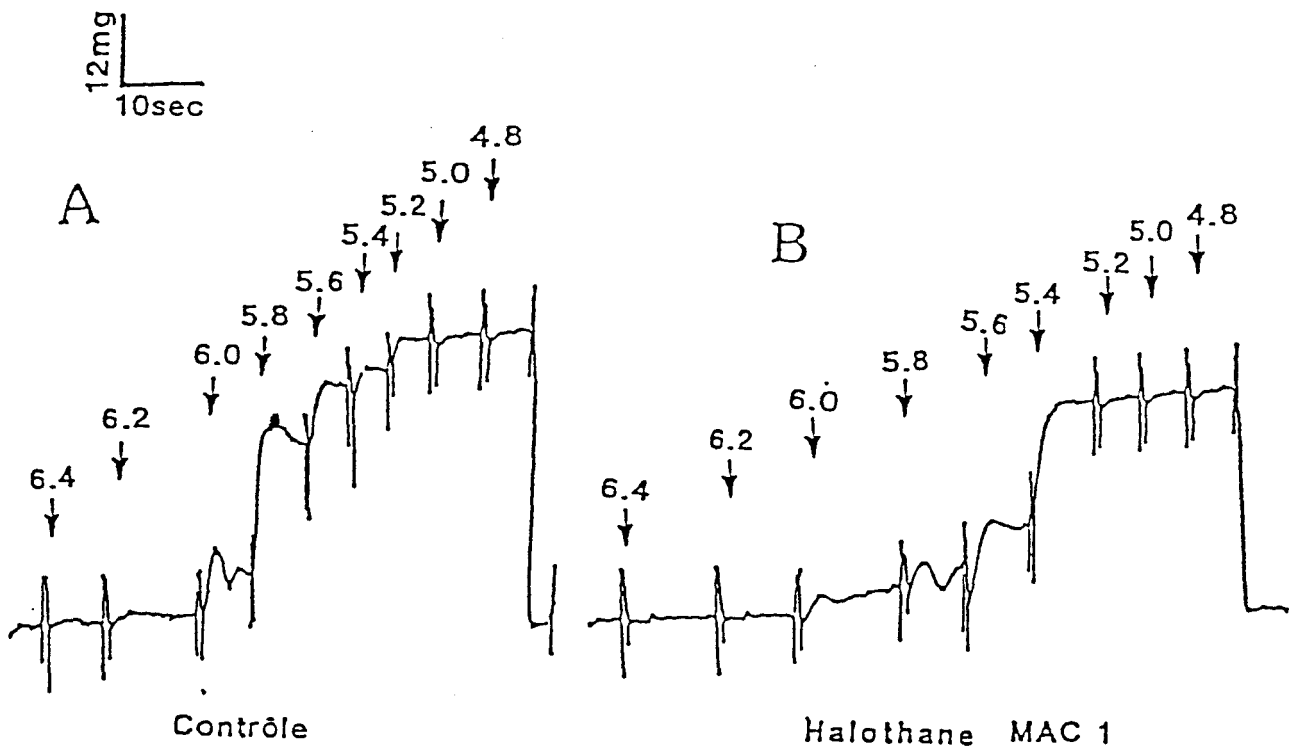


FIGURE 15 : Effet de l'halothane à MAC 1 sur la tension isométrique développée par une fibre squelettique pelée de type I en présence de solutions calcique de concentrations croissantes. (A): tension obtenue en condition contrôle; (B): tension obtenue en présence d'halothane à MAC 1. 10 minutes séparent les deux tracés. Les solutions calciques sont exprimées en pCa ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$).

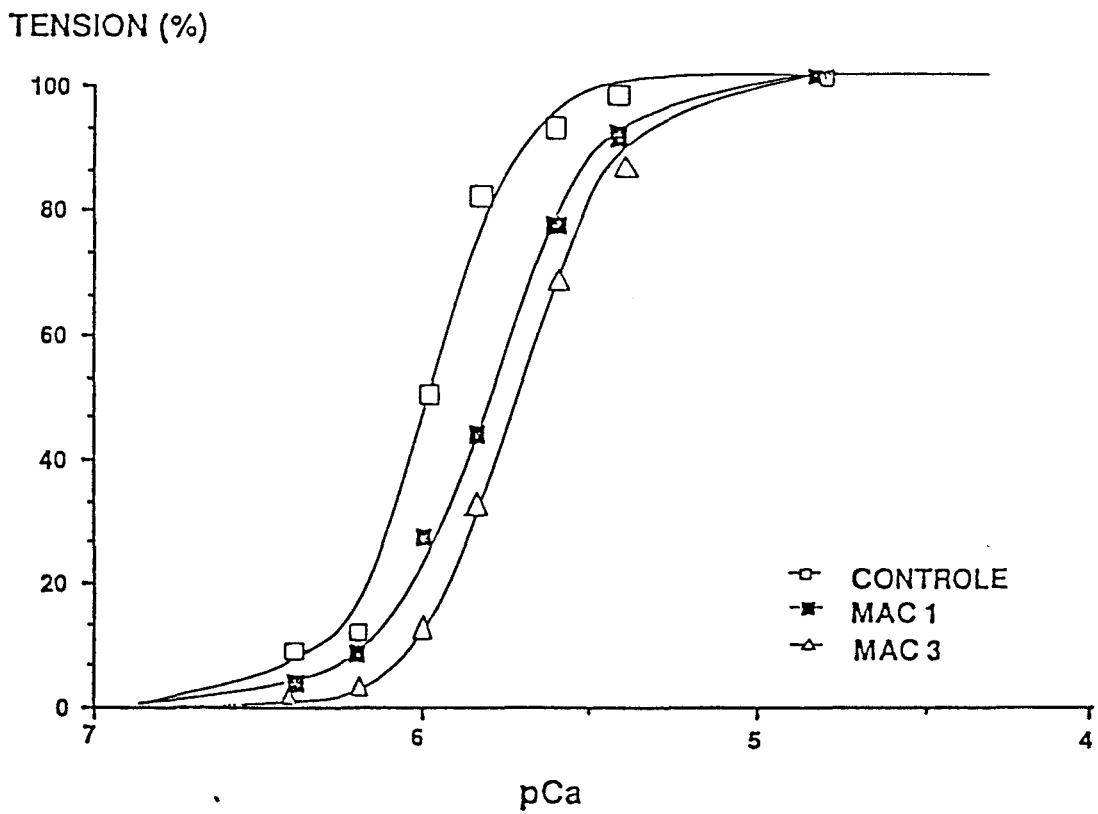


FIGURE 16: Effet de l'halothane à MAC 1 et MAC 3 sur la courbe Tension-pCa normalisée de fibre musculaire squelettique pelée de type I.

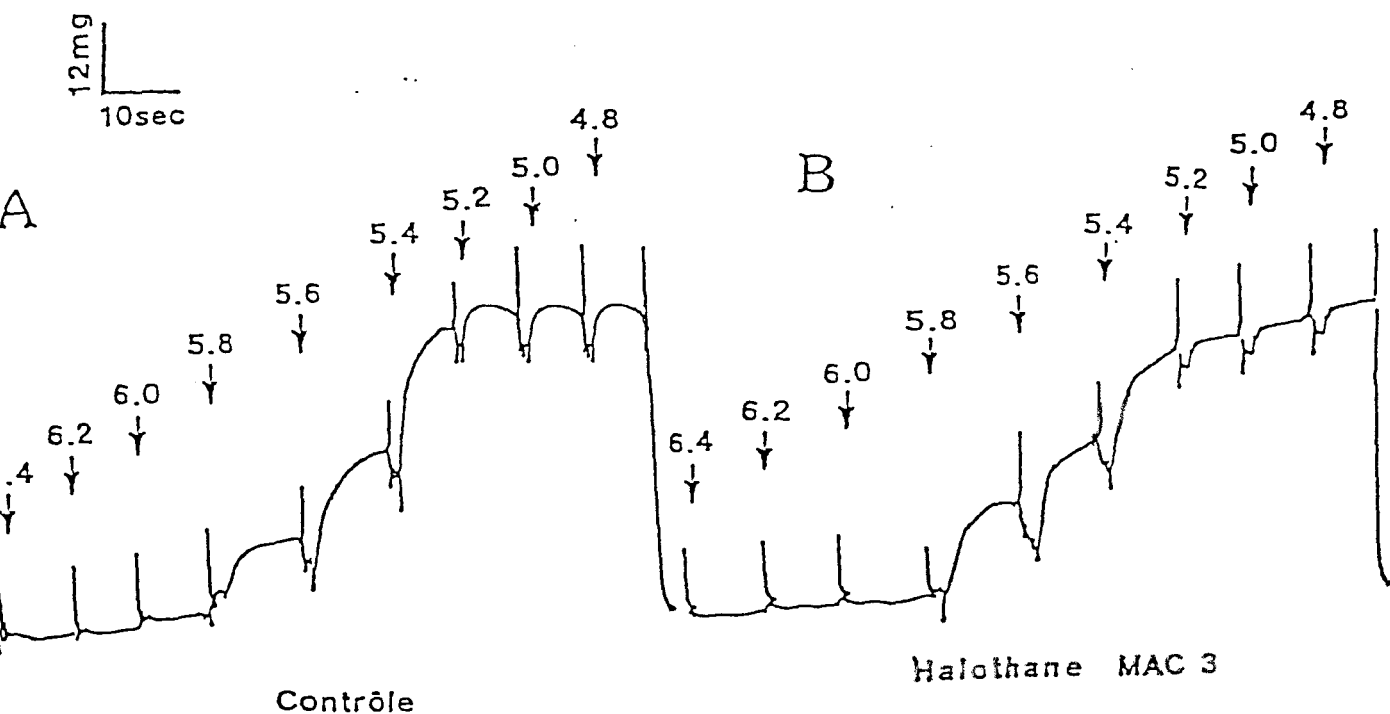


Figure 17 : Effect de l'halothane à MAC 3 sur la tension isométrique développée par une fibre squelettique pelée de type II en présence de solutions calciques de concentrations croissantes. (A) : tension obtenue en condition contrôle ; (B) : tension obtenue en présence d'halothane à MAC 3. 10 minutes séparent les deux tracés. Les solutions calciques sont exprimées en pCa ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$).

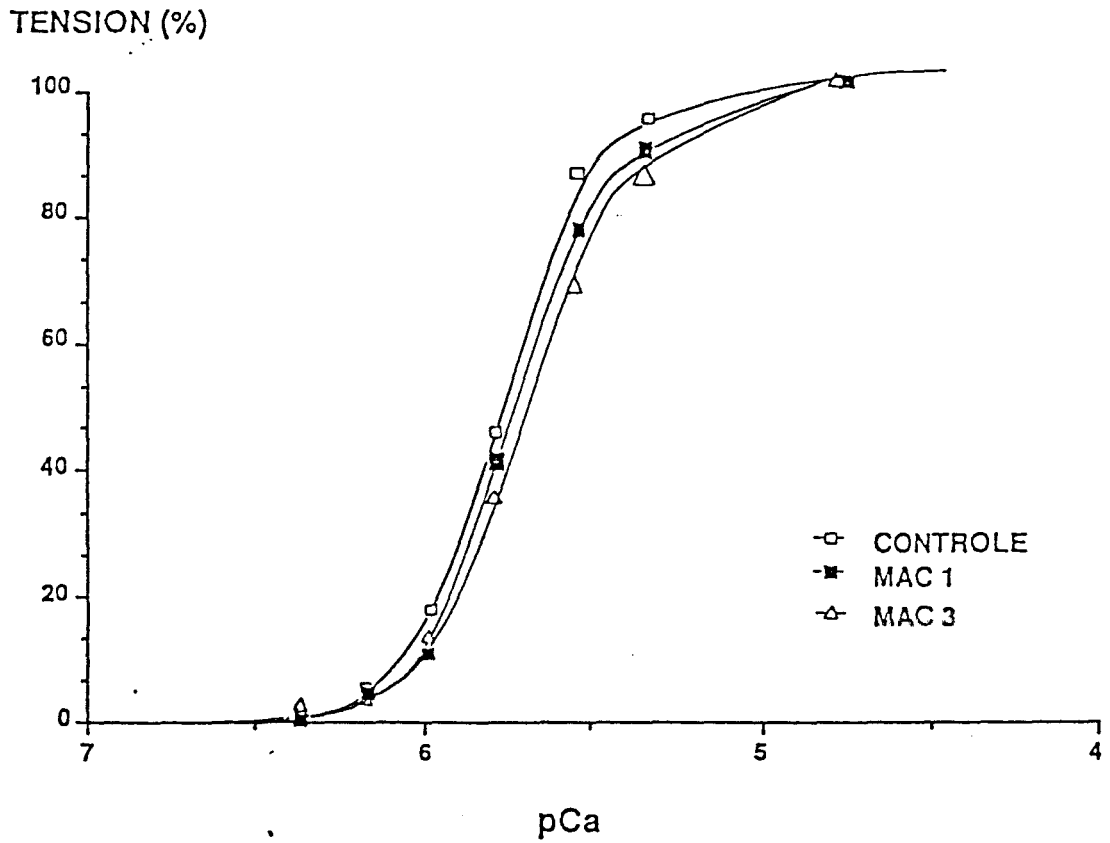


FIGURE 18: Effet de l'halothane à MAC 1 et MAC 3 sur la courbe Tension-pCa normalisée de fibre musculaire squelettique pelée de type II.

Tableau 9 : Caractéristiques fonctionnelles (moyenne \pm SEM) des protéines contractiles en fonction du type de fibres musculaires squelettiques en l'absence et en présence d'halothane (MAC 1 et MAC 3).

	pCa 50		nH		Dim T. Max	
	I	II	I	II	I	II
Contrôle	5,98 \pm 0,03	5,78 \pm 0,02	3,66 \pm 0,39	3,87 \pm 0,40	100	100
MAC 1	5,78 \pm 0,04 *	5,74 \pm 0,03	3,32 \pm 0,56	3,86 \pm 0,60	- 13,16 \pm 1,77 *	- 3,55 \pm 1,74
MAC 3	5,70 \pm 0,05 *	5,70 \pm 0,03	2,46 \pm 0,32	3,23 \pm 0,26	- 20,86 \pm 1,83 *	- 6,95 \pm 2,52

n = nombre de fibres testées (Type I n = 20 ; Type II n = 18)

nH = coefficient de Hill correspondant à la pente de la partie linéaire de la courbe de l'équation de Hill.

Dim T. Max : Diminution de la tension maximale exprimée en pourcentage de la valeur contrôle.

pCa 50 : correspond à la concentration de calcium permettant d'obtenir 50 % de la tension maximale.

* p < 0,05 vs contrôle

IV.5.2 EFFETS DE L'HALOTHANE SUR LA TENSION MAXIMALE DEVELOPPEE PAR LES PROTEINES CONTRACTILES SQUELETTIQUES.

L'étude a été réalisée sur 38 fibres squelettiques pelées dont 20 fibres de type I. Une diminution significative de la tension maximale des fibres squelettiques de type I a été observée à MAC 1 et à MAC 3 et correspondent respectivement à $-13.16 \pm 1.77 \%$ et $-20.86 \pm 1.83 \%$; $p < 0.05$) (figure 19 A et tableau 9). On observe une diminution non significative de la tension maximale des fibres squelettiques de type II en présence d'halothane (figure 19 B et tableau 9). L'effet de l'halothane sur les fibres de type I est important dès la plus faible concentration MAC 1, puis très rapidement atteint son plateau à MAC 3.

IV.5.3 DISCUSSION PARTIELLE.

Dans ce travail, la sensibilité des protéines contractiles est appréciée en enregistrant les changements de force produits en augmentant la concentration en calcium libre au voisinage de la myofibrille. La myofibrille génère une tension à partir des concentrations en calcium de l'ordre de 10^{-6} M et devient maximale à 10^{-5} M. Notre étude montre que l'halothane diminue la sensibilité au calcium et la tension maximale des fibres musculaires de type I (lente). En revanche, l'halothane diminue de manière non significative la tension maximale et ne modifie pas la sensibilité au calcium des fibres musculaires de type II (rapide). La sensibilité au calcium des fibres musculaires de type I et II est également similaire à celle décrite antérieurement pour d'autres muscles de mammifère (TAKAGI et coll., 1978). Nos résultats montrent que le seuil de sensibilité au calcium des fibres de type I est plus bas que celui des fibres de type II.

En effet la courbe Tension - pCa est considérée comme le reflet de la fixation du calcium sur la troponine-C (TN-C). Une augmentation de la tension isométrique est le résultat d'une augmentation de calcium sur les sites régulateurs de la TN-C (KERRICK et coll., 1980). D'après les résultats biochimiques, le coefficient de Hill correspond au nombre de sites calciques sur les TN-C (4 sites dont 2 à haute affinité et 2 à basse affinité). Toutefois les travaux expérimentaux réalisés sur fibres pelées révèlent un coefficient de Hill qui ne reflète pas le nombre de sites calciques de la TN-C. Les valeurs du coefficient de Hill obtenue dans notre étude correspondent à celles décrites par RUFF (1989). Le coefficient de Hill serait un indicateur à la fois de la cinétique

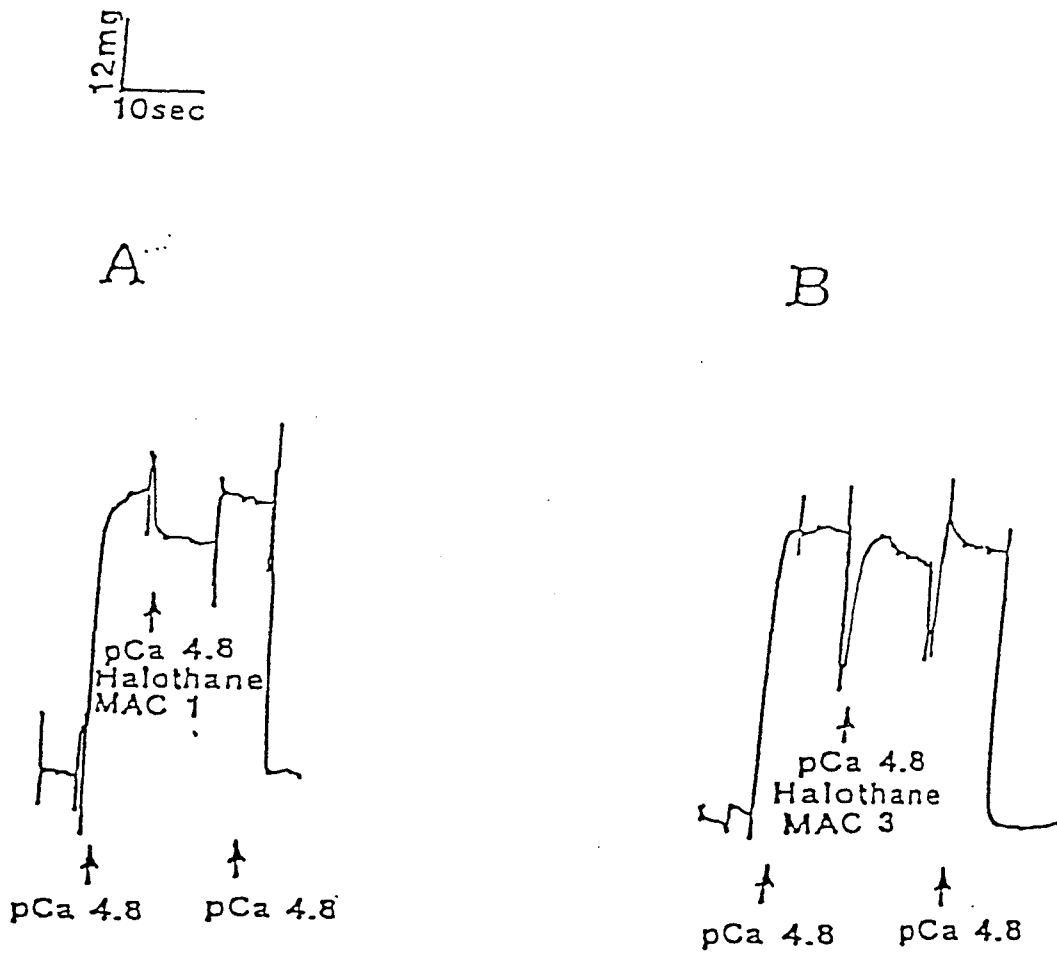


Figure 19 : Effet de l'halothane sur la tension maximale développée par une fibre musculaire squelettique de type I et une de type II. Chaque figure représente la tension maximale développée en présence d'halothane à une concentration calcique à pCa 4.8; cette tension est précédée et suivie d'une tension maximale développée en condition contrôle à la même concentration calcique et en l'absence d'halothane. (A) : tension produite par une fibre de type I en présence d'halothane à MAC 1; (B) : tension produite par une fibre de type II en présence d'halothane à MAC 3.

celles décrites par RUFF (1989). Le coefficient de Hill serait un indicateur à la fois de la cinétique des interactions actine-myosine et de la coopérativité du calcium vis à vis des sites calciques de la TN-C (BRANDT et coll., 1982 ; BRENNER et coll., 1988 ; VENTURA-CLAPIER et coll., 1990). Toutefois, les valeurs absolues varient dans la littérature et dépendent de l'espèce, des conditions d'expérimentation et en particulier de la valeur attribuée à la constante d'affinité de l'EGTA pour le calcium.

La tension maximale normalisée par la section produite par les fibres de type I et II est similaire à celle obtenue par RUFF (1989). En outre, nos résultats montrent que l'action de l'halothane est différente selon le type de fibre squelettique (type I ou II). En effet la tension maximale normalisée reflète la capacité contractile de la fibre. Nos résultats suggèrent que l'halothane influence les propriétés contractiles des myofilaments plus précisément le type d'isomyosine présent. En effet, il n'est pas exclu un effet possible de l'halothane sur les isomyosines des fibres de type lent. Le mécanisme exact responsable de la tension maximale et de la sensibilité au calcium des protéines contractiles des fibres lentes par l'halothane n'est pas établi. Toutefois le rôle possible du système des troponines du muscle lent peut être invoqué dans la diminution de la sensibilité au calcium induite par l'halothane.

CHAPITRE V**CONCLUSION**

Le développement de la contracture par l'halothane est l'expression phénotypique de l'anomalie génétique du muscle sensible à l'HM. Depuis 20 ans, en effet, les tests de contracture *in vitro* ont étudié essentiellement les phénomènes lents (contractures) induits par l'halothane sur le muscle HM et n'ont utilisé le twitch (réponse rapide à un stimulus électrique) que pour s'assurer de la bonne viabilité de la préparation. Tous les travaux se rapportant à la contracture musculaire et au twitch ont été clairement séparés (WILLIAM et coll. 1991 ; ADNET et coll., 1991) et il est admis que ces deux phénomènes s'expliquent par des " substratums " physiopathologiques différents. Les principaux résultats de notre étude démontrent clairement que les effets contracturants et sur le twitch de l'halothane sur le muscle HM apparaissent étroitement liés. Lorsque la contractures musculaire augmente en intensité, les différents temps de relaxation musculaire augmentent également et la vitesse de relaxation diminue. Aussi, le couplage contraction-relaxation (coefficient R) est-il modifié du fait d'un effet lusitrope, indépendant de l'effet inotrope, et spécifique du muscle HM. Sur le muscle normal, ce couplage n'est pas modifié et l'halogéné semble donc exercer des effets inotropes et lusitropes positifs sans que l'on puisse savoir si l'effet lusitrope n'est autre que le résultat inversé de l'effet inotrope positif.

L'utilisation d'agents pharmacologiques dont les mécanismes d'action sont connus, ont permis d'expliquer, en partie, les phénomènes observés. L'inhibition de l'activité de la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique obtenue par l'acide cyclopiazonique permet de reproduire sur le muscle HM les effets de l'halothane sur la relaxation (augmentation des différents temps) et sur les modifications de la tension de base du muscle (contracture). Le CPA induit probablement des effets similaires à l'halogéné (surcharge calcique de la cellule) par des mécanismes différents (inhibition de pompe réticulaire). Sa présence dans la solution de Krebs Ringer à la concentration de 10 μ M renforce considérablement les capacités de l'halothane à induire une surcharge calcique, donc une contracture objectivée dès les plus faibles concentrations d'halothane. Les contractures induites par l'association de CPA et halothane sur les muscles HM sensibles sont significativement plus importantes que celles observées sur les muscles normaux. A noter qu'en présence de CPA, le coefficient R est augmenté dans les deux groupes HMS et HMN, ce qui suggère que l'anomalie princeps de l'HM n'est pas située au

niveau des pompes réticulaires mais que lorsque celles-ci sont bloquées, l'anomalie HM est aggravée.

L'utilisation de vératrine (augmentation du flux sodique entrant) potentialise considérablement les effets de l'halothane à la fois sur le twitch et sur la contracture. Les données de la littérature ont clairement montré qu'il existait une potentialisation similaire avec des agonistes calciques (WILLIAM et coll. 1991 ; ADNET et coll. 1991). De même, une inhibition de la contracture à l'halothane avait été observée avec des inhibiteurs calciques (WILLIAM et coll. 1991 ; ADNET et coll. 1991). Cette inhibition des effets contracturants de l'halothane a également été rapportée avec un milieu extra-cellulaire pauvre en calcium. La participation des canaux sodiques, cependant, n'avait jamais été pharmacologiquement explorée. Une seule étude électrophysiologique (WIELAND et coll. 1989) a montré l'existence d'une anomalie fonctionnelle de ces canaux sodiques voltage-dépendants et il est possible que l'utilisation de BAY K 8644 ne soit pas suffisamment spécifique pour impliquer uniquement les canaux calciques (WILLIAM et coll. 1991 ; ADNET et coll. 1991). L'utilisation de vératrine permettait de résoudre en partie ces problèmes. Nos résultats suggèrent que l'augmentation du flux entrant de sodium participe à l'action de l'halothane. Les mécanismes intra-cellulaires ne sont pas connus : existe-t-il une stimulation du sodium-induced-calcium-release ? ; s'agit-il effectivement d'une anomalie des canaux sodiques du muscle HM ? L'utilisation, dans une étude ultérieure de TTX permettrait une approche encore plus sensible de ce problème.

L'utilisation de fibres pelées à l'EGTA permet d'obtenir une préparation de réticulum sarcoplasmique-protéines contractiles. Sur ce type de préparation, nos études ont clairement montré que l'halothane exerçait une action de libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Cet effet activateur de l'halothane sur la libération de calcium du RS est nettement plus important chez des fibres pelées de sujets sensibles à l'HM que chez les sujets normaux. Ces résultats semblent en accord avec l'hypothèse physiopathologique initiale expliquant aujourd'hui le syndrome HM : une anomalie de fonctionnement du récepteur ryanodine. L'effet de l'halothane est doses dépendant, nécessitent une charge calcique réticulaire préalable et s'exerce sans agent intermédiaire comme le calcium. En particulier, nos résultats montrent que le mécanisme, toujours hypothétique, de calcium induced-calcium release n'est pas

nécessaire à l'action de l'halothane. Cette action de l'halothane a été observée en mesurant des contractures musculaires (donc en mesurant l'activité des protéines contractiles), il était donc important de vérifier les effets propres de l'halothane sur les protéines contractiles. L'halothane diminue la sensibilité au calcium et la tension maximale des fibres musculaires squelettiques. Cet effet est dépendant du type de fibres musculaires, important chez des fibres de type I, non significatif chez les fibres de type II. Cette différence d'effets sur la sensibilité au calcium de l'halothane pourrait être liée à la présence d'isoformes des complexes troponine-myosine. L'effet propre sur les protéines contractiles du muscle HM n'a pas été rapporté par notre étude, mais des résultats préliminaires, réalisés dans notre laboratoire, permettent de penser qu'il n'existe pas de différence dans la réactivité au calcium des protéines contractiles provenant de muscles HM et de muscles normaux.

CONCLUSION

L'ensemble de notre travail a permis d'étudier les effets de l'halothane 1) au niveau du sarcolemme, par l'utilisation d'agents pharmacologiques spécifiques, 2) au niveau du réticulum sarcoplasmique, en utilisant une préparation de fibres pelées à l'EGTA, 3) au niveau des protéines contractiles, en utilisant des fibres pelées à l'EGTA + BRIJ. Les effets de l'halogéné semblent s'exercer à 3 niveaux : 1) modification des perméabilités membranaires externes, 2) libération de calcium du réticulum sarcoplasmique, 3) diminution de la sensibilité au calcium des protéines contractiles pour les fibres de type I. Le troisième effet est probablement peu important et, à l'heure actuelle, il est difficile de différencier clairement l'importance des deux premiers effets in vivo. Compte-tenu des recherches génétiques actuelles (anomalies du gène qui code pour le récepteur ryanodine), il est possible de penser que l'action de l'halothane sur la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique est prédominante dans la pathogénèse de l'HM. Les mécanismes moléculaires, cependant restent à être explorés.

BIBLIOGRAPHIE

ADNET P.J., BROMBERG N.L., HAUDECOEUR G., KRIVOSIC I., ADAMANTIDIS M.M., REYFORD H., BELLO N., KRIVOSIC-HORBER R.M. Fiber type caffeine sensitivities in skinned muscle fibers from humans susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, 1993, 78 : 168-177.

ADNET P.J., KRIVOSIC-HORBER R.M., ADAMANTIDIS M.M., REYFORD H.G., CORDONNIER C., HAUDECOEUR G. Effects of calcium-free solution, calcium antagonists and the calcium agonist BAY K 8644 on mechanical responses of skeletal muscles from patients susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, 1991, 75 : 413-419.

ALLEN D.G., KENTISH J.C. The cellular basis of length-tension relation in cardiac muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1985, 17 : 821-840.

ANDERSON K., LAI A.F., LIU Q.Y., ROUSSEAU E., ERICKSON H.P., MEISSNER G. Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex. *J Biol Chem*, 1989, 264 : 1329-35.

BARNARD R.J., EDGERTON V.R., FURUKAWA T., PETER J.B. Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.*, 1971, 220 : 410-418.

BEELER T., GABLE K. Effect of halothane on Ca²⁺ induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta*, 1985, 821 : 142-152.

BERRIDGE M., IRVINE R.F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 1984, 312 : 315-321.

BERRIDGE M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol : two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, 56 : 159-193.

BLANCK T.J.J., GRUENER R., SUFFECOOL S.L., THOMPSON M. Calcium uptake by isolated sarcoplasmic reticulum : examination of halothane inhibition, pH dependence of normal and malignant hyperthermic human muscle. *Anaesth. Analg.*, 1981, 60 : 492-498.

BLOCK B.A., IMAGAURA T., CAMPELL K.P., FRANZINI-AMSTRONG C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, 1988, 107 : 2587-2600.

BRANDL C.J., DE LEON S., MARTIN D.R., MACLENNAN D.H. Adult forms of the Ca²⁺ ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1987, 262 : 3768-3774.

BRANDL C.J., GREEN N.M., KORCZAK B., MACLENNAN D.H. Two Ca²⁺ ATPase : homologues and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell*, 1986, 44 : 597-607.

BRANDT P.W., COX R.N., KAWAI M., ROBINSON T. Regulation of tension in skinned muscle fibers : effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca²⁺ sensitivity. *J. Gen. Physiol.*, 1982, 79 : 997 -1016.

BRENNER B. Effect of Ca²⁺ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers : Implication for regulation of muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 3265-3269, 1988.

BRISKEY E.J. Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. *Adv. Food. Res.*, 1964, 13 : 89-178.

BRITT B.A., KALOW W., GORDON A., HUMPHREY J.G., REWCASTLE N.B. Malignant hyperthermia : an investigation of five patients. *Can. Anaesth. Soc. J.*, 1973, 20 : 431-442.

BRUM G., FITTS R., PIZARRO G., RIOS E. A mobile charge of the skeletal muscle membrane requires calcium channel to function as voltage sensor of excitation contraction coupling. *J Physiol (Lond)*, 1987, 398 : 475-505.

BRUM G., FITTS R., PIZARRO G., RIOS E. Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *J. Physiol. (Lond)*, 1988, 398 : 475-505.

CAMPBELL K.P., Mac LENNAN D.H. Purification and characterization of the 53,000 dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256 : 4626-4632.

CAMPBELL K.P., SHAMOO A.E. Phosphorylation of heavy sarcoplasmic reticulum vesicles : identification and characterization of three phosphorylated proteins. *J Membr Biol*, 1980, 56 : 241-248.

CARRIER L., VILLAZ M. Effects of halothane on calcium release from sarcoplasmic reticulum of rabbit psoas semitendinous skinned muscle fibers. *Biochem Pharmacol*, 1990, 39 : 145-149.

CATTERALL W.A., STRIESSING J. Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1992, 13 : 256-262.

CHEMLA D., LECARPENTIER Y., MARTIN J.L., CLERGUE M., ANTONETTI A., HATT P.Y. Relationship between inotropy and relaxation in rat myocardium. *Am. J. Physiol.*, 1986, 250 : H1008-H1016.

CHIESI M., CARAFOLI E. The regulation of Ca^{2+} transport by fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257 : 984-991.

CONDRESCU M., LOPEZ J.R., MEDINA P., ALAMO L. Deficient function of the sarcoplasmic reticulum in patients susceptible to malignant hyperthermia. *Muscle & Nerve*, 1987, 10 : 238-241.

DE MEIS L., VIANNA A.L. Energy interconversion by the Ca^{2+} dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.*, 1979, 48 : 275-292.

DENBOROUGH M.A., LOVELL R.R.H. Anesthetic deaths in a family. *Lancet*, 1960, 2 : 45.

DENTON R.M., McCORMACK J.G. On the role of the calcium transport cycle in the heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett*, 1980, 119 : 1-8.

DESMEDT J.E., HAINAUT K. Dantrolene and A23187 ionophore : specific action on calcium channels revealed by the aequorin method. *Biochem Pharmacol*, 1979, 28 : 957-964.

DESMEDT J.E., HAINAUT K. Inhibition of the intracellular release of calcium by dantrolene in barnacle giant muscle fibers. *J Physiol London*, 1977, 265 : 565-585.

DEUSTER P.A., BOCKMAN E.L., MULDOON S. In vitro response of cat skeletal muscle to halothane and caffeine. *J. Appl. Physiol.*, 1985, 58 : 521-527.

DONALDSON S.K., GOLDBERG N.D., WALSETH T.F., HUETTEYMAN D.A. Inositol triphosphate stimulates Ca^{2+} release from peeled skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta.* 927, 92-99, 1987.

ELLIS F.R., HARRIMAN D.G.D., KEANY N.P., KYEI-MENSAH K., TYRRELL J.H. Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br. J. Anaesth.*, 1971, 43 : 721-722.

ELLIS F.R., KEANEY N.P., HARRIMAN D.G.F., SUMMER D.W. Screening for malignant hyperpyrexia. *Br. Med. J.*, 1972, 3 : 559-561.

ELLIS S.B., WILLIAMS M.E., WAYS N.R., BRENNER R., SHARP A.H., LEUNG A.T., CAMPBELL K.P., MacKENN A.E., KOCH W.J., HUI A., SCHWARTZ A., HARPOLD M.M. Sequence and expression of mRNAs encoding the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of the DHP-sensitive calcium channel. *Science*, 1988, 241 : 1661-1664.

ENDO M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*, 1977, 57 : 71-108.

ENDO M., TANAKA M., OGAWA Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature*, 1970, 228 : 34-36.

ENDO M., YAGI S., ISHIZUKA T., HORIUTI K., KOGA Y., AMAHA K. Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia. *Biomed Res*, 1983, 4 : 83-92.

ETCHRIVI T., ADNET P.J., HAUDECOEUR G., REYFORD H., KRIVOSIC-HORBER R.M. Halothane alters the contraction-relaxation coupling in malignant hyperthermia human skeletal muscle. *Anesthesiology*, 1994, 81 : A415.

ETCHRIVI T., TAVERNIER B., ADNET P., NIVOCHÉ Y., KRIVOSIC-HORBER R. Réactivité à l'halothane dépendante du type de fibre musculaire chez des sujets sensibles à l'hyperthermie maligne. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 1994, 14 : R213.

EUROPEAN MALIGNANT HYPERPYREXIA GROUP. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br. J. Anaesth.*, 1984, 56 : 1267-1269.

FABIATO A., FABIATO F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. Paris*, 1979, 75 : 463-505.

FABIATO A., FABIATO F. Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemma. Calcium-dependent cyclic and tonic contraction. *Circ. Res.*, 1972, 31 : 293-307.

FAIRHURST A.S. Effect of ryanodine on skeletal muscle reticulum calcium adenosine triphosphatase (Ca ATPase). *Biochem Pharmacol*, 1973, 22 : 2815-2827.

FAIRHURST A.S., HASSELBACH W. Calcium efflux from a heavy sarcotubular fraction. Effects of ryanodine, caffeine and magnesium. *Eur J Biochem*, 1970, 13 : 504-509.

- FILL M., STEFANI E., NELSON T.E. Abnormal human sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels in malignant hyperthermia skeletal muscle. *Biophys J.* 59, 1085-1090, 1991.
- FLOCKERZI U., OEKEN H.J., HOFMANN F. Purification of a functional receptor for calcium channel blockers from rabbit skeletal muscle microsome. *Eur. J. Biochem.* 1986, 161 : 217-224.
- FLOCKERZI U., OEKEN H.J., HOFMANN F., PELZER D., CAVALIE A., TRAUTWEIN W. Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature Lond.*, 1986, 323 : 66-68.
- FORD L.E., PODOLSKY R.J. Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA-buffered solutions. *J Physiol London*, 1972, 223 : 1-19.
- FORD L.E., PODOLSKY R.J. Regenerative calcium release within muscle cells. *Science*, 1970, 167 : 58-69.
- GERGELY J., LEAVIS P.C. The structure of troponin-C and thin filament regulation in striated muscle. *Muscle contraction : Its regulatory mechanisms.* (Ebashi S. et al. eds); Japan Sci.Soc. Press Tokyo, 191-206, 1980.
- GLOSSMANN H., STRIESSING J. Molecular properties of calcium channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1990, 114 : 1-105.
- GOEGER D.E., RILEY R.T. Interaction of cyclopiazonic acid with rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38 : 3995-4003.
- GORDON A.M., HUXLEY A.F., JULIAN F.J. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres. *J. Physiol.* 184, 170-192, 1966.
- GUNTESKI-HAMBLIN A.M., GREE B.J., SHULL G.E. A model Ca^{2+} pump expressed in brain kidney and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca ATPase gene. *J Biol Chem*, 1988, 263 : 15032-15040.
- HALL L.W., WOOLF N., BRADLEY J.W.P., JOLLY D.W. Unusual reaction to suxamethonium chloride. *Br. Med. J.*, 1966, II : 1305.
- HANSFORD R.G., CASTRO F. Effects of micromolar concentrations of free calcium ions on the reduction of heart mitochondrial, NAD (P) by 2-oxoglutarate. *Biochem J*, 1981, 198 : 525-533.
- HARRISON G.G. Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br. J. Anaesth.*, 1975, 47 : 62-65.
- HELLAM D.C., PODOLSKY R.J. Force measurements in skinned muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*, 1969, 200 : 807-819.
- HIBBERD M.G., JEWELL B.R. Calcium and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J. Physiol (Lond)*, 1982, 329 : 527-540.
- HILL A.V. The energetics of relaxation in a muscle twitch. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1949, 136 : 211-219.
- HILL A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. Roy. Lond. B. Biol. Sci.*, 1938, 126 : 136-195.

- HOFMANN P.A., FUCHS F. Effects of length and cross-bridge attachment on calcium-binding to cardiac troponin-C. *Am. J. Physiol.*, 1987, 253 : C90-C96.
- HUXLEY A.F. Molecular structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Chem.* 7, 255-318, 1957.
- IIAZZO P.A., LEHMANN-HORN F., TAYLOR S.R., GALLANT E.M. Malignant hyperthermia : effects of halothane on the surface membrane. *Muscle & Nerve*, 1989, 12 : 172-183.
- IKEMOTO N. Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum. *Ann Rev Physiol*, 1982, 44 : 297-317.
- INSEI G., SUMBILLA C., KIRTLEY M.E. Relationships of molecular. Structure and function in Ca^{2+} -transport ATPase. *Physiol. Rev.*, 1990, 70 : 749-760.
- INUI M., SAITO A., FLEISCHER S. Purification of the ryanodine receptor and identify with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1987, 262 : 1740-1747.
- JAHN H., NASTAINCZYK W., RÖHRKASTEN A., SCHNEIDER T., HOFMANN F. Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP - dependant protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and calcium kinase II. *Eur J Biochem*, 1988, 178 : 535-542.
- JAY S.D., SHARP A.H., KAHL S.D., VEDVICK T.S., HARPOLD M.M., CAMPBELL K.P. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. α_2 -subunit and the associated δ peptides. *J Biol Chem*, 1991, 266 : 3287-3293.
- JEWEL B.R., WILKIE D.R. The mechanical properties of relaxing muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 1960, 152 : 30-47.
- JEWELL B.R., WILKIE D.R. An analysis of the mechanical components of frog's striated muscle. *J. Physiol.* 143, 515-540, 1958.
- JORGENSEN A.O., CAMPBELL K.P. Evidence for the presence of calsequestrin in two structurally different regions of myocardial sarcoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, 1984, 98 : 1597-1602.
- JORGENSEN A.O., JONES L.R. Localization of phospholamban in slow but not fast canine skeletal muscle fibers. An immunocytochemical and biochemical study. *J Biol Chem*, 1986, 261 : 3775-3781.
- JORGENSEN A.O., SHEN A.C.-Y., CAMPBELL K.P. et al. Ultrastructural localization of calsequestrin in rat skeletal muscle by immunoferriting labeling of ultrathin frozen sections. *J Cell Biol*, 1983, 97 : 1573-1581.
- KALOW W., BRITT B.A., TERREAU M.E., HAIST C. Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet*, 1970, 2 : 895-898.
- KATZ A.M. Interplay between inotropic and lusitropic effects of cyclic adenosine monophosphate on the myocardial cell. *Circulation*, 1990, 82 : I-7-I-11.
- KERRICK W.G.L., SECRIST D., COBY R., LUCAS S. Development of difference between red and white muscles in sensitivity to Ca^{2+} in the rabbit from embryo to adult. *Nature.*, 1976, 260 : 440-441.

KERRICK, W.G.L., MALENCIK K. A., HOAR P.E., POTTER J.D., COBY R.L., POCINWONG S., FISHER E.H. Ca^{2+} and Sr^{2+} activation : Comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.* 386 : 207-213, 1980.

KIM D.H., IKEMOTO N. Involvement of 60-kilodalton phosphoprotein in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261 : 11674-11679.

KIM D.H., OHNISHI S.T., IKEMOTO N. Kinetic studies of calcium release from sarcoplasmic reticulum in vitro. *J Biol Chem*, 1983, 258 : 9662-9668.

KIM D.H., SRETER F.A., IKEMOTO N. Involvement of the 60 KDa phosphoprotein in the regulation of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of normal and malignant hyperthermia susceptible pig muscles. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1988, 945 : 246-252.

KIM D.H., SRETER F.A., OHNISHI S.T., RYAN J.F., ROBERTS J., ALLEN P.D., MESZAROS L.G., ANTONIU B., IKEMOTO N. Kinetic studies of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of normal and malignant hyperthermia susceptible pig muscles. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 755 : 320-324.

KIRINO Y., SHIMIZU H. Ca^{2+} induced Ca^{2+} release from fragmented sarcoplasmic reticulum : a comparison with skinned muscle fiber studies. *J Biochem Tokyo*, 1982, 992 : 1287-1296.

KOLB M.E., HORNE M.L., MARTZ R. Dantrolene in human MH. *Anesthesiology*, 1982, 56 : 254-262.

KORCZAK B., ZARAIN-HERZBERG A., BRANDL C.J. et al. Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca^{2+} ATPase gene. *J Biol Chem*, 1988, 263 : 4813-4819.

KRIVOSIC-HORBER R., ADNET P. Tests de dépistage de la sensibilité à l'hyperthermie maligne. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 1989, 8 : 444-456.

KUREBAYASHI N., OGAWA Y. Discrimination of Ca^{2+} -ATPase activity of the sarcoplasmic reticulum from actomyosin-type ATPase activity of myofibrils in skinned mammalian skeletal muscle fibres : distinct effects of cyclopiazonic acid on the two ATPase activities. *J. Muscle Res. and Cell. Motility*, 12, 355-365, 1991.

LAI F.A., ERICKSON H.P., ROUSSEAU E., LIU Q.Y., MEISSNER G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 1988, 331 : 315-319.

LAMB G.D., WALSK T. Calcium currents charge movement and dihydropyridine binding in fast and slow twitch muscles of rat and rabbit. *J Physiol (london)*, 1988, 393 : 595-617.

LEA T.J., GRIFFITHS P.J., TREGEAR R.T., ASHLEY C.C. An examination of the ability of inositol 1,4,5-triphosphate to induce calcium release and tension development in skinned skeletal muscle fibres of frog and crustacea. *FEBS Lett.*, 1986, 207 : 153-161.

LECARPENTIER Y., CHEMLA D., CLERGUE M., MARTIN J.L. Cardiac relaxation : load sensitivity and sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, 1987, 251 : H1285-H1286.

LECARPENTIER Y.C., MARTIN J.L., CLAES V., CHAMBARET J.P., MIGUS A., ANTONETTI A. Real-time kinetics of sarcomere relaxation by laser diffraction. *Circ. Res.*, 1985, 56 : 331-339.

LEUNG A.T., IMAGAWA T., BLOCK B., FRANZINI-AMSTRONG C., CAMPBELL K.P. Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000-DA subunit. *J Biol Chem*, 1988, 263 : 994-1001.

LEUNG A.T., IMAGAWA T., CAMPBELL K.P. Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca^{2+} channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem*, 1987, 262 : 7943-7946.

LOPEZ J.R., ALAMO L., CAPUTO L., WIKINSKI J., LEDEZMA D. Intracellular ionized calcium concentration in muscles from humans with malignant hyperthermia. *Muscle & Nerve*, 1985, 8 : 355-358.

LOPEZ J.R., MEDINA P., ALAMO L. Dantrolene sodium is able to reduce the resting ionic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in muscle from humans with malignant hyperthermia. *Muscle & Nerve*, 1987, 10 : 77-79.

Mac CLENNAN D.H., DUFF G., ZORZATO et al. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*, 1990, 343 : 559-561.

Mac LENNAN D.H., BRANDL C.J., KORCZAK B. et al. Amino-acid sequence of $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 1985, 316 : 696-700.

MACINTOSH D., BERMAN M.C. Neutral lipid and phospholipid composition of normal and myopathic skeletal muscle of pigs. *S. African J.*, 1973, 48 : 1221.

MARTONOSI A. The development of sarcoplasmic reticulum membranes. *Ann Rev Physiol*, 1982, 44 : 337-355.

MARTONOSI A.N. Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol Rev*, 1984, 64 : 1240-1320.

MARTONOSI A.N., BEELER T.J. Mechanism of Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum. *Handbook of Physiology*, 10 (eds. Peachey, L.D., Adrian, R.H., GEIGER, S.R.) 1983, pp 417-485, Am. Physiol. Soc., Bethesda, Maryland.

Mc CARTHY T.V., HEALY J.M., HEFFRON J.J. et al. Localization of the malignant hyperthermia. Susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature*, 1990, 343 : 562-564.

MEISSNER G. Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+} induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259 : 2365-2374.

MEISSNER G. Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 1986, 25 : 244-251.

MEISSNER G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1986, 261 : 6300-6306.

MICHELSON J.R., ROSS J.A., REED B.K., LOUIS C.F. Enhanced Ca^{2+} induced Ca^{2+} release by isolated sarcoplasmic reticulum vesicles from malignant hyperthermia susceptible pig muscle. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 862 : 318-328.

MICKELSON J.R., GALLANT E.M., LITTERER L.A., JOHNSON K.M., REMPEL W.E., LOUIS C.F. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 9310-9315.

MICKELSON J.R., ROSS J.A., HYSLOP R.J., GALLANT E.M., LOUIS C.F. Skeletal muscle sarcolemma in malignant hyperthermia : evidence for a defect in calcium regulation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1987, 897 : 364-376.

MITCHELL R.D., SIMMERMAN H.K.B., JONES L.R. Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263 : 1376-1381.

MIYAMOTO H., RACKER E. Calcium-induced calcium release at terminal cisternae of skeletal sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 1981, 133 : 235-238.

MIYAMOTO H., RACKER E. Mechanism of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J Membr Biol*, 1982, 66 : 193-201.

MOVSESIAN M.A., NISHIKAWA M., ADELSTEIN R.S. Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake. *J Biol Chem*, 1984, 259 : 8029-8032.

NAGASAKI K., KASAI M. Fast release of calcium from sarcoplasmic reticulum vesicles monitored by chlortetracycline fluorescence. *J. Biochem.* 1983, 94 : 1101-1109.

NEER E.J., CLAPHAM D.E. Role of G protein structures in transmembrane signalling. *Nature*, 1988, 333 : 129-134.

NELSON T.E. Abnormalities in calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia. *J. Clin. Invest.*, 1983, 72 : 862-870.

NELSON T.E. Halothane effects on human malignant hyperthermia skeletal muscle single calcium-release channels in planar lipid bilayers. *Anesthesiology*, 1992, 76 : 588-595.

NELSON T.E. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the malignant hyperthermia syndrome. Recent advances in malignant hyperthermia. 1987, Ed. B.A. Britt, Academic Publications, HINGHAM pp. 43-78.

NELSON T.E., CHAUSMER B.A. Calcium content and contracture in isolated muscle of malignant hyperthermia in pigs. *J.pharmacol. Exp. Ther.* 219 : 107-111, 1981.

NORTH AMERICAN MALIGNANT HYPERTHERMIA GROUP. Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesth. Analg.*, 1989, 69 : 511-515.

O'BRIEN P.J. Microassay for malignant hyperthermia susceptibility : hypersensitive ligand-gating of the Ca channel in muscle sarcoplasmic reticulum causes increased amounts and rates of Ca-release. *Mol. Cell. Biochem.*, 1990, 93 : 53-59.

OGAWA Y., KUREBAYASHI N. The Ca-releasing action of halothane on fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 1982, 3 : 39-56.

- OGAWA Y., KUREBAYASHI N. The Ca-releasing action of halothane on fragmented sarcoplasmic reticulum. *J Biochem*, 1982, 92 : 899-905.
- OHNISHI S. Calcium-induced calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1979, 86 : 1147-1150.
- OHNISHI S.T. Effects of halothane, caffeine-dantrolene and tetracaine on the calcium permeability of skeletal sarcoplasmic reticulum of malignant hyperthermic pigs. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1987, 897 : 261-268.
- OHNISHI T.S., TAYLOR S., GRONERT S.A. Calcium-induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia : the effects of halothane and dantrolene. *FEBS Letters*, 1983, 161 : 103-107.
- OHTA T., ENDO M., NAKANO T., MOROHOSHI Y., WANIKAWA K., AHGA A. Ca-induced-Ca²⁺ release in malignant hyperthermia susceptible pig skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 1989, 256 : C358-C367.
- ORDING H. Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia in man. *Br. J. Anaesth.*, 1988, 60 : 287-302.
- ORENTLICHER M., REUBEN J.P., GRUNDFEST H., BRANDT P.W. Calcium-binding and tension development in detergent treated muscle fiber. *J. Gen. Physiol.*, 1974, 63 : 168-186.
- PALADE P. Drug-induced Ca²⁺ release from isolated sarcoplasmic reticulum. II- Releases involving the Ca²⁺ induced Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem*, 1987, 262 : 6142-6148.
- PERY-MAN N., CHEMLA D., COIRAULT C., SUARD I, RIOU B., LECARPENTIER Y. A comparison of cyclopiazonic acid and ryanodine effects on cardiac muscle relaxation. *Am. J. Physiol.*, 1993, 256 : H.1364-H.1372.
- PESSAH I.N., FRANCINI A.O., SCALES D.J., WATERHOUSE A.L., CASIDA J.E. Calcium ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1986, 261 : 8643-8.
- PETER J.B., BARNARD R.J., EDGERTON V.R., GILLEPSIE C.A., STEMPEL K.E. Metabolic profiles of three types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 1972, 11 : 2627-2633.
- POTREAU D., RAYMOND G. Existence of a sodium-induced calcium release mechanism on frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol. London.*, 1982, 333, 463-480.
- PUTNEY J.W., BIANCHI C.P. Site of action of dantrolene in Frog sartorius muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1974, 189 : 202-212.
- RADON D.P., CEFALI D.C., MITCHELL R.D., SEILER S.M., JONES L.R. High molecular weight proteins purified from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum vesicles are ryanodine sensitive calcium channels. *Circ Res*, 1990, 64 : 779-89.
- RANVIER C. Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *C.R. Acad. Sci. USA, Paris* 1977 : 1030-1034.
- RICARDO B., J.J. MARENGO. Calcium-dependent halothane activation of sarcoplasmic reticulum calcium channels from frog skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1994, 266 (cell physiol 35) : C391-C386.

- RIOS E., BRUN G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, 1987, 325 : 717-720.
- RIOS E., PIZARRO G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev*, 1991, 71 : 849-908.
- RUFF R.L. Calcium sensitivity of fast and slow twitch human muscle fibres. *Muscle & Nerve*, 1989, 12 : 32-37.
- SALVIATI G., CEOLDO S., FACHECHI-CASSANO G., BETTO R. Ca release from skeletal muscle SR : effects of a volatile anesthetics. In : *Mechanisms of anesthetic action in skeletal, cardiac, and smooth muscle*, Edited by T.J.J. Blanck and D.M. Wheder, Plenum Press New York, 1991, p. 31-42.
- SALVIATI G., SORENSON M.M., EASTWOOD A.B. Calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in two populations of chemically skinned human muscle fibers : effects of calcium and cyclic AMP. *J Gen Physiol*, 1982, 79 : 603-632.
- SALVIATI G., VOLPE P. Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skinned fast and slow twitch muscle fibers. *Am. J. Physiol* 1988, 254 : C459-C465.
- SCHERER N.M., FERGUSON J.E. Inositol 1,4,5-triphosphate is not effective in releasing calcium from skeletal sarcoplasmic reticulum microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 128 : 1064-1070.
- SEIDLER N.W., JONA C., NEGH M., MARTONOSI A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264 : 17816-17823.
- SEILER S., WEGENER A.D., WANG D.H., HATHAWAY D.R., JONES L.R. High molecular weight proteins in cardiac and skeletal junctional sarcoplasmic reticulum vesicles bind calmodulin, are phosphorylated, and are degraded by Ca²⁺ activated protease. *J Biol Chem*, 1984, 259 : 8550-8557.
- SENGUPTA C., MEYER U.A., CARAFOLI E. Binding of dantrolene sodium to muscle intracellular membranes. *FEBS Lett*, 1980, 117 : 37-38.
- SHAH A.J., PAGALA M.K.D., SUBRAMANI V., VENKATACHARI S.A.T., SAHGAL V. Effect of fiber types, fascicle size and halothane on caffeine contractures in rat muscle. *J. Neurol. Sciences*, 1988, 88 : 247-260.
- SMITH J.S., IMA GAWA T., MA J., FILL M., CAMPBELL K., CORONADO R. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle in the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*, 1988, 92 : 1-26.
- SMITH J.S., ROUSSEAU E., MEISSNER G. Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ Res*, 1989, 64 : 352-359.
- SNYDER H.R., DAVIS C.S., BICKERTON R.K., HALLIDAY R.P. 1-[(5-arylfurfurylidase) amino] hydantoins, a new class of muscle relaxants. *J. Med. Chem.*, 1967, 10 : 807-809.
- STEPHENSON D.G., WENDT I.R. Length dependence of changes in sarcoplasmic calcium concentration and myofibrillar calcium sensitivity in striated muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 1984, 5 : 243-273.

STEPHENSON E.W. Activation of fast skeletal muscle : contributions of studies on skinned muscle fibers. *Am J Physiol*, 1981, 240 : C1-C19.

STREHLER E., PERIASAMY M., STREHLER-PAGE M.A. et al. Myosin light-chain 1 and 3 has two structurally distinct and differently regulated parameters evolving at different rates. *Mol Cell Biol*, 1985, 5 : 3168-3182.

SUTKO J.L., KENYON J.L. Ryanodine modification of cardiac muscle responses to potassium-free solutions. Evidence for inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release. *J Gen Phys*, 1983, 404-

TADA M., KATZ A.M. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol*, 1982, 44 : 401-423.

TADA M., YAMAMOTO T., TONOMURA Y. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*, 1978, 58 : 1-79.

TAKAGI A. Abnormality of sarcoplasmic reticulum in malignant hyperpyrexia. *Adv Neurol Res*, 1976, 20 : 107-113.

TAKAGI A., SUNOHARA N., ISHIHARA T., MONAKA I., SUGITA H. Malignant hyperthermia and related neuromuscular diseases : caffeine contracture of the skinned muscle fibers. *Muscle & Nerve*, 1983, 6 : 510-515.

TAKAGI A., YONE MOTO K., SUGITA H. Single-skinned human muscle fibers. Activation by calcium and strontium. *Neurology.*, 1978, 28 : 497-499.

TAKESHIMA H., NISHIMURA S., MATSUMOTO T., ISHIDA H., KANGAWA K., MINAMINO N., MATSUO H., UEDA M., HANAOKA M., HIROSE T., NUMA S. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 1989, 339 : 439-445.

TANABE T., TAKESHIMA H., MIKAMI A., FLOCKERZI V., TAKAHASHI H., KANAGAWA K., KOJIMA M., MATSUO H., HIROSE T., NUMA S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 1987, 328 : 313-318.

THORENS S., ENDO. Calcium-induced calcium release and depolarization-induced calcium release : their physiological significance. *Proc. Jpn. Acad.*, 1975, 51 : 473-478.

VENTURA-CAPLIER R. Fibres pelées. Recherches en hypertrophie et insuffisances cardiaques. B. SWYNGHEDAUW, (INSERM / John Libbey Eurotext), 1990 : p. 173-181.

VERGARA T., TSIEN R.Y., DELAY M. Inositol, 1,4,5-triphosphate : a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6352-6356, 1985.

VITTONI C., CINGOLANI H.E., MATTIAZZI R.A. The link between contraction and relaxation : the effects of calcium antagonists. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1985, 17 : 255-263.

VOLPE P., DIVIRGILIO F., POZZAN T. Inositol triphosphate and muscle : caution is a must. *TIBS*, 1987, 12 : 139-140.

VOLPE P., ZORZATO F., POZZAN T., SALVIATI G., DIVIRGILIO F. Measurement of calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle : effect of calcium and inositol 1,4,5-triphosphate. In "Methods in Enzymology" 141 (Eds Conn, P.M. 8 Means, A.R.) 3-18. Academic Press, New York, 1987a.

WANG T., GRASSI DE GENDE A.O., SCHWARTZ A. Kinetic properties of calcium adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum isolated from cat skeletal muscles. A comparison of cardiofemoralis (fast), tibialis (mixed) and loysis (slow). *J. Biol. Chem.*, 1979, 254 : 10675-10678.

WIELAND S.J., FLETCHER J.E., ROSENBERG H., QI-HUA GON. Malignant hyperthermia : slow sodium current in cultured human muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 1989, 257 : C759-C765.

WILLIAMS H.J., HOLLAND M., LEE J.C., CHRISTOPHER W.W., DAVY KEVIN P. Effects of Bay K 8644, nifedipine and two Ca^{2+} on halothane and caffeine potentiation. *J. Appl. Physiol.*, 1991, 71 : 721-726.

WOOD D.S. Human skeletal muscle : analysis of Ca^{2+} regulation in skinned fiber using caffeine. *Exp. Neurology.*, 1978, 58 : 218-230.

WOOD D.S., ZOLLMAN J., REUBEN J.P. Human skeletal muscle : properties of the "chemically skinned" fiber. *Science*, 1975, 187 : 1075-1076.

ZOT A.S., POTTER J.D. Reciprocal coupling between troponin C and myosin cross-bridge attachment. *Biochemistry*, 1989 : 28 : 6751-6756.

RESUME EN ANGLAIS

Malignant hyperthermia (MH) is a potentially lethal disorder in which sustained muscle contracture is triggered by inhalational anaesthetics and depolarising muscle relaxant in susceptible individual. In order to understand the mechanism involved, the first part of the present study assesses to what degree MH-related changes in regulation of sarcoplasmic calcium are reflected by altered contraction-relaxation parameters. Our results showed that halothane had marked effect on the relaxation phase of MH muscle only. However halothane exposure improved contractility parameters in normal muscle. In MH muscle, the halothane induced contracture was significantly enhanced in the presence of cyclopiazonic acid (CPA) (inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) or veratrine (Na^{+} -agonist). Our study demonstrated that in MH muscle, in the presence of CPA or veratrine, halothane induced a negative inotropic and lusitropic effects which was associated with a modification of intrinsic properties of relaxation.

The second part of the study carried out a comparative study of halothane sensitivity of the sarcoplasmic reticulum (SR) of fast and slow normal human and MH chemically skinned fibers muscle. In MH fibers the calcium release mechanism showed a significantly higher sensitivity to halothane than in normal muscle fibers. Both type I (slow) and II (fast) MH fibers had significantly lower halothane sensitivities and this increase in halothane sensitivity was similar both in type I and type II fibers. The effect of halothane on Ca-activated tension production of the contractile system were examined on skinned skeletal muscle fibers from normal human. The effect of halothane was more pronounced in type I fiber than in type II fiber. Maximum Ca-activated force production in type I fiber was depressed by halothane. The increase in apparent calcium sensitivity produced by halothane can result from a direct effect of halothane on myofilaments which leads to a change in the apparent affinity constant of the force controlling binding sites for calcium.

These results suggest that the principal cause of MH is due to the enhancement of the halothane-induced calcium release mechanism of the SR of the skeletal muscle.

KEY-WORDS : Skeletal muscle, malignant hyperthermia, muscle contracture, relaxation, contraction-relaxation coupling, skinned fiber, halothane sensitivity, fast and slow fibers.

