

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]



**Les canaux K^+ du réticulum sarcoplasmique cardiaque
présentent des propriétés électrophysiologiques et un profil
pharmacologique différents de leurs homologues de la
membrane de surface.**

par
Luc Picard

Département de Physiologie et de Biophysique
Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en physiologie (biophysique)

Composition du Jury

Dr. Paul C. Pape, représentant du programme
Dr. Éric Rousseau, maître de thèse
Dr. Daniel Lajeunesse, examinateur externe

22 mai 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74500-7

Résumé

Luc Picard. Les canaux K^+ du réticulum sarcoplasmique cardiaque présentent des propriétés électrophysiologiques et un profil pharmacologique différents de leurs homologues de la membrane de surface.

Le couplage excitation-contraction au niveau cardiaque nécessite une augmentation rapide et transitoire de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Le Ca^{2+} nécessaire à la contraction cardiaque est contenu à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique (RS) et est libéré par un mécanisme appelé « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release ». Il a été rapporté que la libération rapide du Ca^{2+} par le RS est inhibée lorsque les mouvements des ions K^+ et/ou Cl^- à travers le RS sont bloqués. Cette étude a permis de caractériser le profil électrophysiologique et pharmacologique des canaux K^+ du RS dérivé de cellules atriales d'humains et d'ovins. Des expériences de liaison spécifique à la [3H]-Ryanodine et des analyses comparatives sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) ont été réalisées sur des préparations de RS atriales de mammifères supérieurs. La liaison spécifique de la [3H]-Ryanodine sur le canal Ca^{2+} du RS a été inhibée par le rouge de ruthénium et le Mg^{2+} avec des valeurs d' IC_{50} de $4.11\mu M$ et de 9.12 mM respectivement. Les protéines de ces mêmes fractions ont été reconstituées dans des bicouches lipidiques planes. L'activité d'un canal sélectif aux ions monovalents a été enregistrée. Ce canal présente une grande conductance unitaire de 193 pS et 185 pS pour des préparations humaines et ovines respectivement. L'amplitude du courant, la conductance ainsi que sa cinétique n'ont pas été affectées par l'addition de 5 mM de 4-AP, 100 nM d'IbTX, $3\mu M$ de E-4031 et $30\mu M$ d'amiodarone. Ces résultats démontrent que le canal K^+ du RS, présent dans toutes les préparations de mammifères supérieurs testées, a un profil pharmacologique différent de celui des canaux K^+ des membranes de surface. Malgré le fait que les propriétés du canal sont relativement bien connues, l'identité moléculaire du canal K^+ du RS reste à être élucidée.

Mots clefs : Oreillette, Humain, Ovin, Couplage excitation-contraction, Cœur, Canaux K^+ , Réticulum Sarcoplasmique

Table des matières

RÉSUMÉ	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	VI
INTRODUCTION	1
ANATOMIE CARDIAQUE	1
L'INFLUX CARDIAQUE.....	2
LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION AU NIVEAU SQUELETTIQUE	3
LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION AU NIVEAU CARDIAQUE	5
LE RÉTICULUM SARCOPLASMIQUE	7
CANAUX K^+ ET Cl^- DU RS	10
RÔLE DES CANAUX K^+ AU NIVEAU CARDIAQUE.....	12
Canaux K^+ voltage-dépendants.....	13
Canaux K^+ dépendants du voltage et de ligands	14
Canaux K^+ modulés par ligands endogènes.....	14
AUTRES CANAUX K^+ DES MEMBRANES DE SURFACE DES CELLULES DE MAMMIFÈRES.....	15
Canaux K^+ activés par le Ca^{2+}	15
VUE DYNAMIQUE SUR LE FONCTIONNEMENT DES CANAUX K^+	16
La cavité centrale.....	16
Le filtre de sélectivité	17
LE CANAL K^+ DU RS.....	20
CONTEXTE, BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES DU PROJET.....	21
Contexte.....	21
But	22
Objectifs spécifiques de mon projet.....	22
MATÉRIEL ET MÉTHODES	23
PRÉPARATION DES MICROVÉSICULES ATRIALES.....	23
CARACTÉRISATION DES MICROVÉSICULES ATRIALES	27
Dosage des protéines	27
Expérience de liaison à la [3H]-ryanodine	27
Gels de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	29
TECHNIQUE DE RECONSTITUTION MEMBRANAIRE	29
Description générale de la méthode.....	29
Description du montage expérimental	30
Composition de la membrane artificielle et prétraitement.....	31
Formation de la membrane artificielle et gradient osmotique.....	33

Incorporation et fusion des microvésicules.....	34
Description de l'appareillage électronique.....	36
Analyse des signaux.....	39
Analyse statistiques.....	41
RÉSULTATS	42
CARACTÉRISATION DES FRACTIONS MICROSOMALES	42
Liaison spécifique à la [³ H]-ryanodine sur les fractions microsomales	42
Profil protéique des différentes fractions microsomales	44
EFFETS DU ROUGE DE RUTHÉNIUM SUR LA LIAISON À LA [³H]-RYANODINE.....	46
EFFETS DU Mg²⁺ SUR LA LIAISON À LA [³H]-RYANODINE.....	47
RECONSTITUTION MEMBRANAIRE DES CANAUX Cl⁻ DU RS OVIN.....	50
RECONSTITUTION MEMBRANAIRE DES CANAUX K⁺ DU RS HUMAIN ET OVIN..	53
INSENSIBILITÉ DES CANAUX K⁺ DU RS À DES BLOQUEURS DES CANAUX K⁺	
DU SL	58
Les canaux K ⁺ du RS sont insensibles à la 4-AP	58
L'IbTX n'affecte pas les canaux K ⁺ du RS.....	59
INSENSIBILITÉ PHARMACOLOGIQUE À DEUX ANTIDYSRYTHMIQUES.....	62
insensibilité au E-4031.....	62
insensibilité à l'amiodarone	62
DISCUSSION.....	65
CARACTÉRISATION DES FRACTIONS MICROSOMALES	66
EFFET DU ROUGE DE RUTHÉNIUM ET DU Mg²⁺	68
ANALYSE DE LA RECONSTITUTION DES CANAUX K⁺ DANS LES BLPs.....	69
PARAMÈTRES SERVANT À LA CLASSIFICATION.....	70
CONCLUSION	75
PERSPECTIVES	76
REMERCIEMENTS	77
BIBLIOGRAPHIE	78

Liste des tableaux

TABLEAU 1 - SOLUTIONS UTILISÉES DANS LA PRÉPARATIONS DES FRACTIONS MICROSOMALES DE COEURS CANINS ET OVINS.	25
TABLEAU 2 - COCKTAIL D'INHIBITEURS DE PROTÉASES UTILISÉS DANS LA PRÉPARATION DES FRACTIONS MICROSOMALES CARDIAQUES HUMAINES, OVINES ET CANINES.	25
TABLEAU 3 – COMPOSITION DU TAMPON DE « BINDING » UTILISÉ LORS DES EXPÉRIENCES DE LIAISON À LA [³ H]-RYANODINE.....	28
TABLEAU 4 – SOLUTIONS DE KCl UTILISÉES DANS LES CHAMBRES EXPÉRIMENTALES LORS DES EXPÉRIENCES DE RECONSTITUTION MEMBRANAIRE.	33

Liste des figures

FIGURE 1- SCHÉMA RÉSUMANT LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION AU NIVEAU DES MUSCLES SQUELETTIQUES.....	4
FIGURE 2- SCHÉMA DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION CARDIAQUE :	6
FIGURE 3- STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE D'UNE FIBRE MUSCULAIRE STRIÉE.	9
FIGURE 4- RÔLE DES CANAUX Cl^- ET K^+ DU RS LORS DE LA LIBÉRATION RAPIDE (A) ET DU REPOMPAGE DU Ca^{2+} (B).	11
FIGURE 5- DIFFÉRENTES PHASES D'UN POTENTIEL D'ACTION AURICULAIRE.	12
FIGURE 6- HYDRATATION D'UN ION K^+ DANS LA CAVITÉ CENTRALE DU PORE PAR HUIT MOLÉCULE D'EAU DISPOSÉE EN PLAN POLAIRE.	17
FIGURE 7- POSITIONS ADOPTÉES PAR LES IONS K^+ LORSQU'ILS PASSENT À TRAVERS LE FILTRE DE SÉLECTIVITÉ.	19
FIGURE 8- ÉTAPES MENANT À L'ISOLEMENT DES FRACTIONS MICROSOMALES.....	26
FIGURE 9- DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL MONTRANT LES CHAMBRES (<i>CIS</i> ET <i>TRANS</i>) ET LA TÊTE DU PRÉAMPLIFICATEUR.	31
FIGURE 10- STRUCTURES CHIMIQUES PLANES DES TROIS PHOSPHOLIPIDES UTILISÉS POUR LES EXPÉRIENCES DE RECONSTITUTION MEMBRANAIRE.	32
FIGURE 11- ASPECT DE L'ORIFICE DE 250 μm APRÈS PRÉTRAITEMENT PAR UN MÉLANGE DE PHOSPHOLIPIDES DANS DU $CHCl_3$ ET ÉVAPORATION DE CE DERNIER.....	33
FIGURE 12- FUSION DANS LA MEMBRANE D'UNE MICROVÉSICULE COMPORTANT 2 CANAUX IONIQUES À LA MEMBRANE ARTIFICIELLE.	35
FIGURE 13- SCHÉMA DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL UTILISÉ LORS DES EXPÉRIENCES DE RECONSTITUTION MEMBRANAIRE.....	38

FIGURE 14 – LIAISON SPÉCIFIQUE DE LA [³ H]-RYANODINE SUR LES DIFFÉRENTES FRACTIONS MICROSOMALES ISOLÉES À PARTIR DE LA FRACTION MICROSOMALE BRUTE.....	43
FIGURE 15 – PROFIL PROTÉIQUE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS ANALYSÉES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE).	45
FIGURE 16 – COURBES D’INHIBITION DE LA LIAISON À LA [³ H]-RYANODINE INDUIT PAR LE ROUGE DE RUTHÉNIUM ET LE Mg ²⁺	49
FIGURE 17 – CARACTÉRISTIQUES FONCTIONNELLES ET ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES DU CANAL Cl ⁺ DÉRIVÉ DU RS OVIN.	52
FIGURE 18 – CARACTÉRISTIQUES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES DES CANAUX K ⁺ DÉRIVÉS DU RS ATRIALE HUMAIN ET OVIN.....	56
FIGURE 19 – COURBES DE LA PO EN FONCTION DU VOLTAGE POUR DES PRÉPARATIONS ATRIALES DE RS D’HUMAINS.	57
FIGURE 20 –LE CANAL K ⁺ DU RS ATRIAL HUMAIN EST RELATIVEMENT INSENSIBLE À LA 4- AP.	60
FIGURE 21 – LE CANAL K ⁺ DU RS ATRIAL HUMAIN N’EST PAS BLOQUÉ PAR L’IbTX.....	61
FIGURE 22 – LE CANAL K ⁺ DU RS ATRIAL OVIN EST INSENSIBLE AU E-4031.....	63
FIGURE 23 – LE CANAL K ⁺ DU RS ATRIAL HUMAIN EST INSENSIBLE À L’AMIODARONE.....	64

Liste des symboles et abréviations

4-AP	4-Aminopyridine
AMP	Adénosine 3',5'-monophosphate
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BLP	Bicouches Lipidiques Planes
CICR	« Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release »
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CSQ	Calséquestrine
DHPRs	Récepteur aux dihydropyridines
DTT	DL-Dithiotreitol
EGTA	Ethyleneglycol-Bis-(β-amino-ethyl-ether) N,N'-Tetraacetic Acid
GMPc	Guanosine 3',5'-monophosphate
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IbTX	Ibériotoxine
IC₅₀	Concentration induisant 50% de l'inhibition
K_d	Constante de dissociation
MOPS	3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid
PA	Potentiel d'action
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
P_o	Probabilité d'ouverture d'un canal

PS	Phosphatidylsérine
RS	Réticulum Sarcoplasmique
RyR	Récepteur à la ryanodine
SDS	Sodium dodecylsulfate
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
SERCA	Sarco[Endo]plasmique Reticulum $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase
SL	Sarcolemme
TEA⁺	Tétraéthylammonium
Tris	Trizma base, [tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane]
V_{0.5}	Potentiel de demi-activation
V_m	Potentiel de membrane

Introduction

Anatomie cardiaque

Le cœur est l'organe moteur du système cardiovasculaire. Il a la responsabilité de pomper le sang dans tous les vaisseaux sanguins de l'organisme de façon à fournir les différents nutriments et l'oxygène nécessaires au bon fonctionnement de tous les tissus de l'organisme. Il participe en même temps à l'élimination du CO₂ via la circulation pulmonaire. Le CO₂ est par la suite expiré par les poumons. Le cœur est composé de trois couches tissulaires soient l'épicarde (couche externe), le myocarde (couche médiane) et l'endocarde (couche interne) (Tortora et al., 1994). L'épicarde est composé de mésothélium et de tissu conjonctif et tapisse la paroi externe du cœur. Le myocarde est le tissu musculaire du cœur responsable de la contraction cardiaque. C'est dans le myocarde qu'on retrouve les fibres musculaires cardiaques striées, ramifiées et involontaires. Ces fibres sont disposées tout autour du cœur et forment deux grands réseaux : un réseau auriculaire et un réseau ventriculaire. Chaque fibre est reliée aux fibres adjacentes par des structures qui apparaissent comme des épaissements transversaux de la membrane sarcolemmale appelés disques intercalaires. Ces disques intercalaires renferment des jonctions serrées qui permettent la propagation du potentiel d'action d'une fibre à l'autre et des desmosomes qui attachent les cellules les unes aux autres (Torora et al., 1994). L'endocarde est en continuité avec l'endothélium des gros vaisseaux sanguins et tapisse l'intérieur du cœur. Le cœur se divise en quatre cavités. Les oreillettes droite et gauche sont les cavités supérieures et les ventricules droit et gauche sont les cavités inférieures. L'oreillette droite est séparée du ventricule droit par

la valvule tricuspide. L'oreillette gauche est séparée du ventricule gauche par la valvule bicuspide.

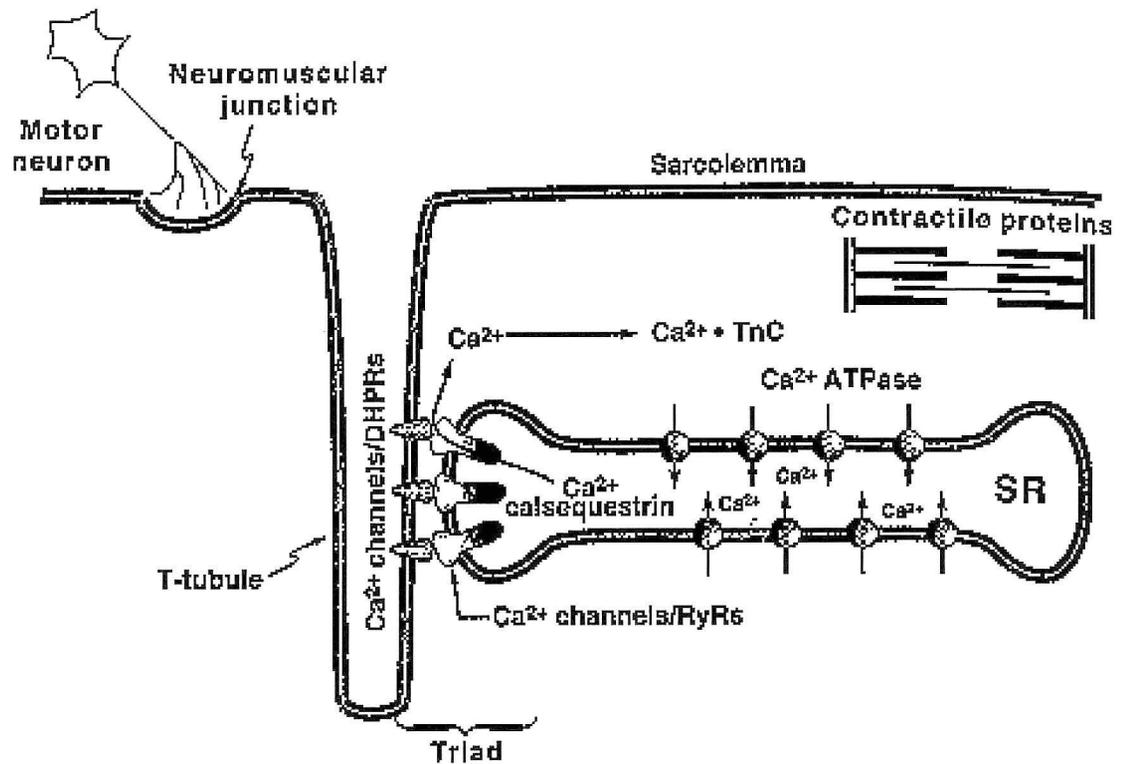
L'influx cardiaque

Pour que la contraction cardiaque soit efficace, les cellules cardiaques doivent toutes se contracter en même temps avec néanmoins un léger déphasage d'excitation entre l'apex et le haut des ventricules. Le cœur nécessite donc d'abord et avant tout un bon système de conduction de façon à transmettre l'influx cardiaque à travers toute le cœur de façon rapide et efficace. L'excitation cardiaque est initiée au niveau du nœud sinusal situé dans la paroi de l'oreillette droite. Le nœud sinusal est le pacemaker du cœur et c'est lui qui donne le rythme au cœur (Tortora, 1994). L'influx se propage par la suite dans les fibres auriculaires vers le nœud auriculo-ventriculaire (AV), ensuite vers les branches gauche et droite, à travers le septum interventriculaire vers l'apex du cœur. Le réseau de fibres de Purkinje propage ensuite l'influx cardiaque dans tout la masse du tissu ventriculaire (Opie, 1998). Les fibres de Purkinje ont une vitesse de conduction extrêmement élevée (200 cm/s) pour plusieurs raisons. Premièrement, les cellules de Purkinje ont un diamètre environ trois fois plus grand que les autres myocytes ventriculaires. La résistance s'opposant à la conduction décroît à mesure que le diamètre augmente donc le grand diamètre des fibres de Purkinje lui permet de conduire l'influx plus rapidement (Opie, 1998). Deuxièmement, les cellules des fibres de Purkinje renferment des disques intercalaires qui sont situés entre elles. Ce sont des jonctions serrées composées de desmosomes et de connexons formant les « gap junctions » qui facilitent la conduction entre les cellules (Tortora, 1994). Finalement les fibres de Purkinje ont une densité de canaux Na^+ plus élevée ≈ 200 canaux/ μm^2 (Bean et al., 1989)

que les autres cellules du ventricule ≈ 43 canaux/ μm^2 (Hanck et al., 1990). Cette grande conductivité des fibres de Purkinje permet aux cellules ventriculaires d'être excitées presque simultanément de façon à ce que le cœur se contracte comme un syncytium.

Le couplage excitation-contraction au niveau squelettique

L'augmentation transitoire de la concentration du Ca^{2+} dans le myocyte cardiaque est le signal intermédiaire entre la dépolarisation électrique du sarcolemme et l'activation des microfilaments (Rice et al., 2001). Ce phénomène est défini comme étant le couplage excitation-contraction. C'est le processus du passage de l'excitation électrique à la contraction (Bers, 2002). De façon générale, le couplage excitation-contraction au niveau des muscles squelettiques débute par l'arrivée d'un potentiel d'action (PA) au niveau de la membrane sarcolemmale. Celui-ci se propage le long de celle-ci par l'entremise des canaux Na^+ . L'ouverture de ces canaux sodiques provoque un changement de voltage au niveau du sarcolemme. Cette différence de potentiel active les canaux Ca^{2+} de la membrane sarcolemmale (DHPRs) et le changement de conformation des DHPRs active directement les canaux Ca^{2+} du RS (Fig. 1) puisqu'au niveau squelettique, les DHPRs sont liés morphologiquement au Récepteur à la Ryanodine (RyRs). L'ouverture des canaux calciques-RyRs- provoque une augmentation rapide de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et la contraction peut ensuite prendre place. Le couplage excitation-contraction au niveau cardiaque est plus complexe qu'au niveau squelettique et il sera décrit plus en détail dans la prochaine section puisque mon projet s'est intéressé au niveau cardiaque.



Sprekalis, 1997

Figure 1- Schéma résumant le couplage excitation-contraction au niveau des muscles squelettiques.

Le changement de configuration des DHPRs engendré par les changements de voltage au niveau de la membrane sarcolemmale et du système tubulaire transversal active les canaux calciques du RS=RyR₁.

Le couplage excitation-contraction au niveau cardiaque

Au niveau des cellules cardiaques, le couplage excitation-contraction est semblable à celui des cellules des muscles squelettiques. Il existe cependant des différences (Franzini-Armstrong et al., 1997; Leong et al., 1998; Franzini-Armstrong, 1999). Au niveau cardiaque, ce phénomène est appelé « Ca^{2+} -induced / Ca^{2+} -release » (CICR). Le couplage excitation-contraction débute également par l'arrivée d'un PA qui parcourt la membrane sarcolemmale par l'entremise des canaux Na^+ . Les cellules ventriculaires cardiaques ont un potentiel de repos d'environ -78 mV (Opie, 1998). Lorsque ces cellules sont activées par le PA arrivant de la fibre voisine, les canaux Na^+ voltage-dépendants s'ouvrent très rapidement et laisse entrer du Na^+ dans le myoplasme. Cette ouverture des canaux sodiques et l'entrée rapide de Na^+ à l'intérieur de la cellule crée une dépolarisation rapide. Cette dépolarisation au niveau du sarcolemme provoque l'activation des canaux Ca^{2+} de type-L (voltage-dépendants), qui sont également les récepteurs aux dihydropyridines (DHPRs) (Cheng et al., 1996; Franzini-Armstrong et al., 1997; Franzini-Armstrong et al., 1998). L'ouverture de ces canaux Ca^{2+} de type-L laisse entrer du Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule qui active à son tour les canaux Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS), appelés les récepteurs à la ryanodine (RyRs) (Sutko et al., 1996; Franzini-Armstrong et al., 1997; Sutko et al., 1997; Wagenknecht et al., 1997; Franzini-Armstrong et al., 1998). C'est cette libération du Ca^{2+} du RS qui provoque une augmentation rapide de la concentration calcique à l'intérieur du myoplasme. Le Ca^{2+} se lie ensuite à la troponine C pour induire un changement de conformation et ainsi libérer les sites actifs de la myosine pour que l'actine puisse s'y lier (Tortora et al., 1994). Pour que la relaxation des myofilaments puisse suivre, la concentration de Ca^{2+} à l'intérieur du

myoplasme doit diminuer. Ceci nécessite le transport du Ca^{2+} à l'extérieur du myoplasme par quatre voies connues. D'abord par la $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase du RS, par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane sarcolemmale, par la $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de la membrane sarcolemmale et par le transport uniport du Ca^{2+} à l'intérieur des mitochondries (Bers, 2002).

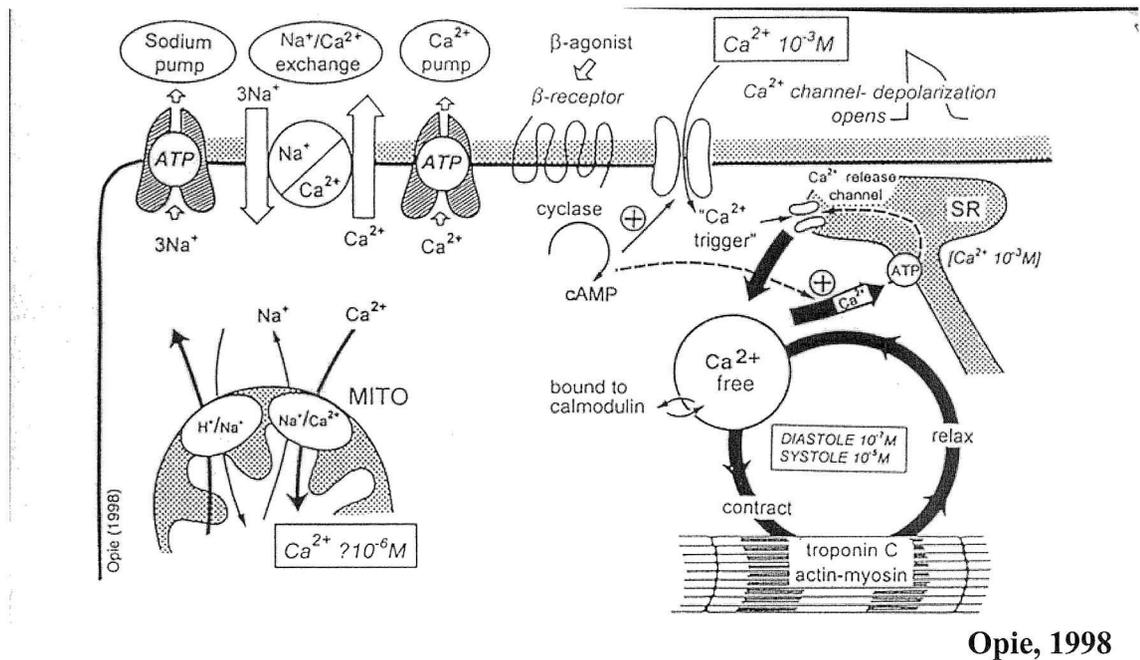


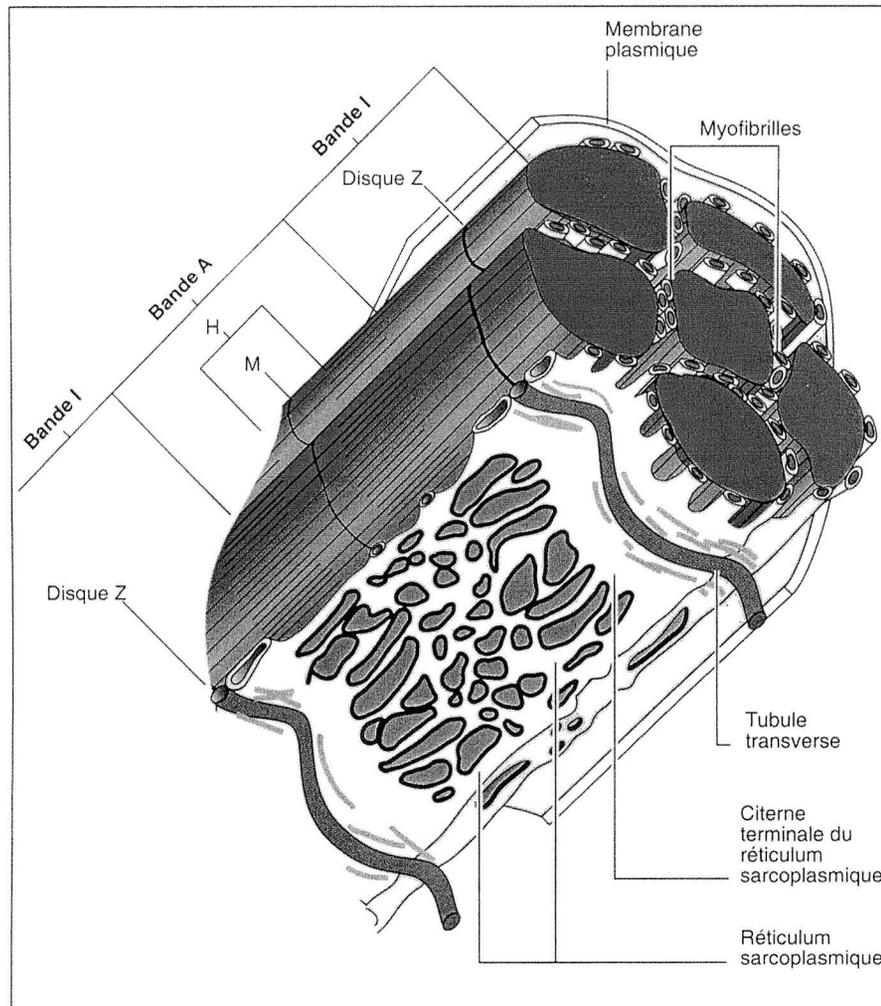
Figure 2- Schéma du couplage excitation-contraction cardiaque :

L'entrée du Ca^{2+} par l'ouverture des canaux Ca^{2+} de la membrane sarcolemmale (DHPRs) correspond à la phase « Ca^{2+} -induced » et l'activation des canaux Ca^{2+} du RS (RyRs) par cette entrée de Ca^{2+} correspond à la phase « Ca^{2+} -release ».

Le Réticulum Sarcoplasmique

Dans toutes les cellules musculaires striées des mammifères, les variations de Ca^{2+} intracellulaire, menant au bon fonctionnement du phénomène CICR et éventuellement de la contraction musculaire, sont contrôlées majoritairement par le réticulum sarcoplasmique (RS). Le RS est un organel qui a comme fonction de servir de réservoir afin de séquestrer le Ca^{2+} pour le libérer rapidement dans le myoplasme lors du transitoire calcique ($d\text{Ca}/dt$) qui déclenche la contraction (Endo, 1977; Martonosi, 1984). Il est constitué d'un réseau de membranes intracellulaires disposées entre les myofilaments cellulaires. Le RS présente deux régions distinctes soit le RS longitudinal et le RS jonctionnel. Le RS longitudinal est disposé parallèlement à l'axe des cellules musculaires alors que le RS jonctionnel correspond aux citernes terminales qui sont en contiguïté avec le système tubulaire transverse (Fig. 3) (Rousseau et al., 1992). Au niveau des muscles squelettiques, ces citernes terminales sont en contact avec la membrane des tubules T alors qu'au niveau cardiaque, ces citernes peuvent également être apposées à la membrane sarcolemmale (diades) (Sommer et al., 1979). Le mécanisme du couplage excitation-contraction dans le cœur s'effectue au niveau de ces jonctions entre les citernes terminales et la membrane de surface. Au repos, le Ca^{2+} contenu dans le RS est majoritairement lié à la calséquestrine (CSQ), une protéine qui servirait d'« éponge » pour le Ca^{2+} lors de son stockage (Scott et al., 1988; Yano et al., 1994). Le mécanisme moléculaire précis menant à la libération du Ca^{2+} de la CSQ lors du couplage excitation-contraction est encore mal connu mais la triadine (Caswell et al., 1991; Knudson et al., 1993a; Knudson et al., 1993b) et la junctine (Jones et al., 1995) seraient des protéines qui communiqueraient potentiellement avec la CSQ (Scott et al., 1988; Zhang et al., 1997). Suite à la libération

du Ca^{2+} dans le myoplasme de la cellule, celui-ci est repompé à l'intérieur du RS par une pompe appelé $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Martonosi, 1984). Au niveau cardiaque, c'est la pompe SERCA 2 qui est majoritairement présente (Lompre et al., 1994). Le repompage du Ca^{2+} à l'intérieur du RS induit la relaxation de la cellule cardiaque. On a longtemps cru que les cellules atriales étaient dépourvues en RS fonctionnel. Des études ont par la suite démontré que les cellules auriculaires présentaient bel et bien un RS mais qui était différent de celui au niveau ventriculaire (Sommer et al., 1976; Bossen et al., 1981). Plusieurs études ont aussi montré que le RS auriculaire était entouré des structures nécessaire au couplage excitation-contraction comme la caséquestrine, la troponine C, la pompe $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (SERCA), la triadine, la junctine et le phospholamban. Le phospholamban interagissait avec la pompe $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase et provoquerait l'inhibition de celle-ci (Cornea et al., 1997; Kadambi et al., 1997). Par la suite, notre laboratoire démontrait la présence des canaux Ca^{2+} , Cl^- et K^+ au niveau du RS des cellules atriales humaines prouvant ainsi que le RS existait vraiment au niveau auriculaire (Côté et al., 2001).



Rousseau et al., 1992

Figure 3- Structure tridimensionnelle d'une fibre musculaire striée.

Les citernes terminales sont en contiguïté avec le système tubulaire transverse (réticulum sarcoplasmique jonctionnel). Le couplage excitation-contraction s'effectue au niveau de ces jonctions qui correspondent aux disques Z. Bandes I : bandes constituées de filaments fins d'actine. Disque Z : zone d'attachement des filaments d'actine.

Canaux K^+ et Cl^- du RS

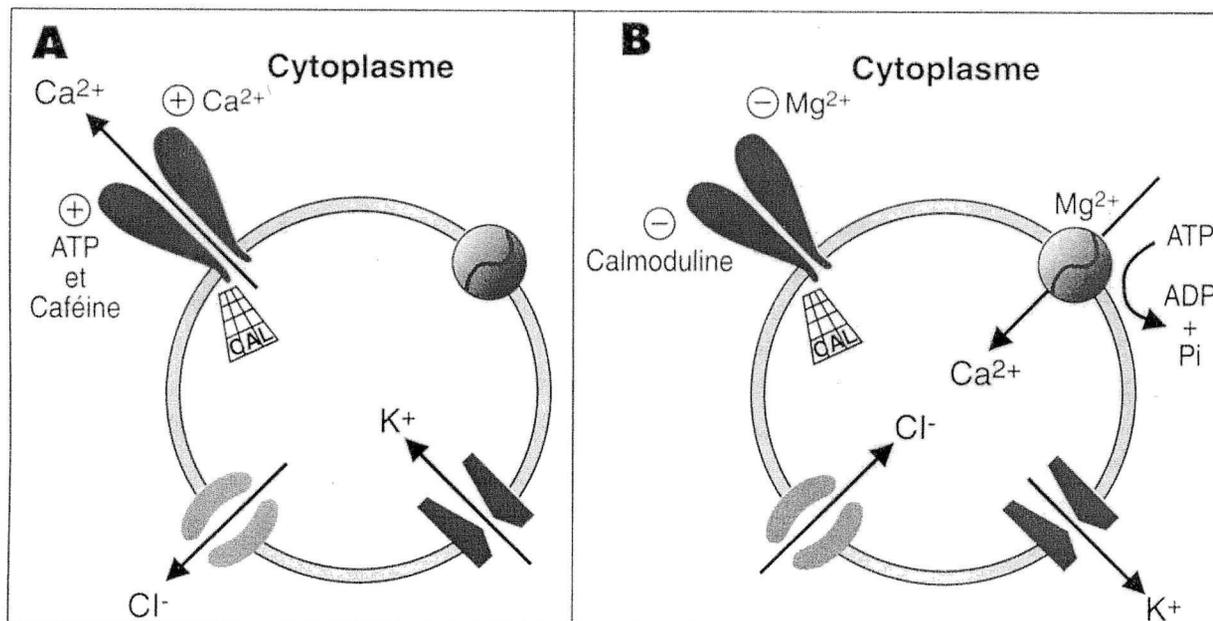
Au premier abord, les canaux K^+ et Cl^- du RS ne sont jamais présentés comme ayant un rôle majeur par rapport au « Ca^{2+} -release channel » que sont les RyRs mais ils sont néanmoins essentiel au bon fonctionnement du RS et donc à l'efficacité du couplage excitation-contraction. Comme discuté antérieurement, la libération du Ca^{2+} contenu à l'intérieur du RS est à l'origine de la contraction musculaire. Le repompage du Ca^{2+} par la pompe $Ca^{2+}Mg^{2+}$ ATPase (SERCA) à l'intérieur du RS, lui, contribue à la relaxation (Martonosi, 1984). Tous les mouvements de Ca^{2+} à travers le RS doivent être et sont accompagnés par des mouvements de contre-charges à travers la membrane du RS. Ces mouvements de contre-charges sont nécessaires pour l'entrée et la libération rapide de Ca^{2+} dans la mesure où ils contribuent à garder le potentiel membranaire du RS éloigné de E_{Ca} et à maintenir l'électroneutralité du système membranaire du RS (Rousseau et al., 1992). La force électromotrice exercée sur les ions Ca^{2+} est régie par l'équation suivante où « I_{Ca} » représente le courant des ions Ca^{2+} , « V_m » le potentiel membranaire du RS et « E_{Ca} » le potentiel d'équilibre du Ca^{2+} :

$$I_{Ca} = (V_{RS} - E_{Ca})$$

De toute évidence, si V_{RS} était égal à E_{Ca} , la force électromotrice sur les ions serait égale à zéro et le mouvement net des ions Ca^{2+} nul. E_{Ca} est déterminé par l'équation suivante où « R » représente la constante des gaz parfaits (8.314 VC/K mol), « T » la température en Kelvin (295 K), « Z » la valence de l'ion Ca^{2+} (+2) et « F » la constante de Faraday (96.48×10^{-4} C/mol) :

$$E_{Ca^{2+}} = \frac{RT}{ZF} \frac{\ln[Ca^{2+}]_{out}}{\ln[Ca^{2+}]_{in}}$$

Ainsi, lors de la libération rapide du Ca^{2+} , des ions Cl^- quitte la lumière du RS vers le cytoplasme (Fig. 4A) et des ions K^+ entre dans le RS. Lors du repompage, le mouvement des ions Cl^- et K^+ est inversé (Fig. 4B).



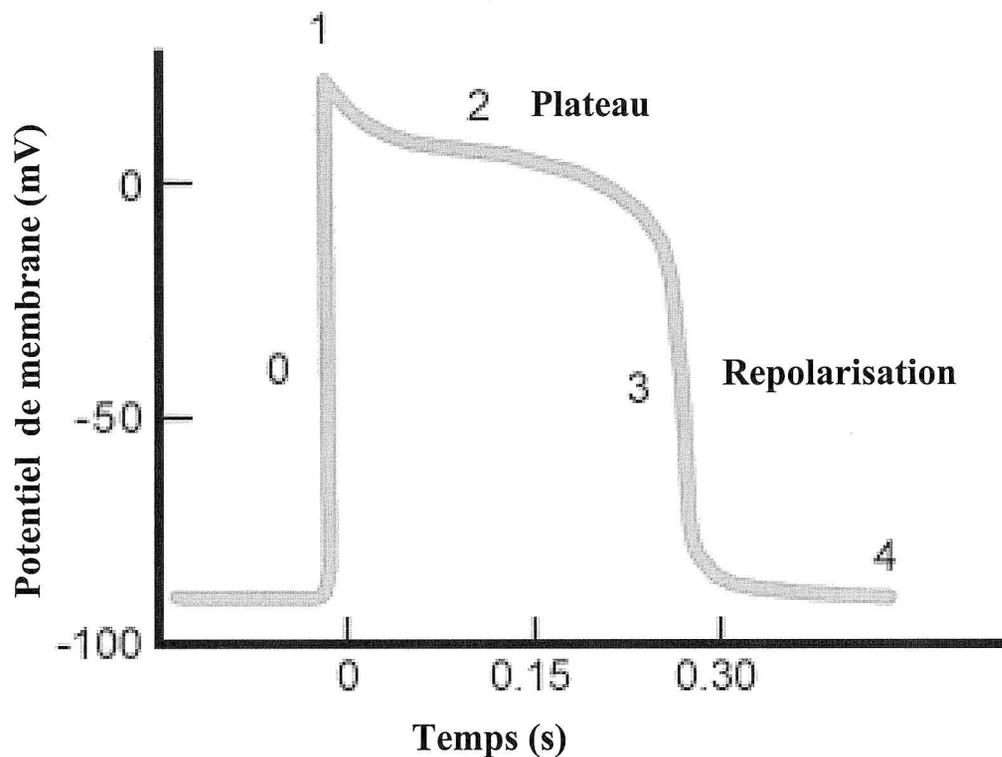
Rousseau et al., 1992

Figure 4-Rôle des canaux Cl^- et K^+ du RS lors de la libération rapide (A) et du repompage du Ca^{2+} (B).

(A) Lors de la libération rapide du Ca^{2+} dans le cytoplasme, des ions Cl^- quitte la lumière du RS et des ions K^+ entre dans le RS. (B) Lors du repompage des ions Ca^{2+} , les ions Cl^- et les ions K^+ se déplacent dans le sens inverse. Ce mouvement des ions Cl^- et K^+ lors des mouvements de Ca^{2+} est nécessaire pour maintenir le potentiel membranaire du RS éloigné de E_{Ca} et à maintenir l'électroneutralité du système membranaire du RS.

Rôle des canaux K^+ au niveau cardiaque

Le PA des cellules ventriculaires cardiaques comprend cinq phases soit la phase 0, 1, 2, 3 et 4 (Boyett, 1986). Les canaux K^+ des membranes de surface contribuent de façon générale à la phase de repolarisation du PA. D'une région du cœur à l'autre, la forme et le déroulement d'un PA (Fig. 5) varie considérablement en raison de l'expression cellulaire différentielle de plusieurs gènes de canaux K^+ (Barry et al., 1996; Tristani-Firouzi et al., 2001).



Reprise et adaptée de Sperelakis, 1997

Figure 5- Différentes phases d'un potentiel d'action auriculaire.

La phase 0 correspond à la dépolarisation, la phase 1 à la repolarisation rapide, la phase 2 au plateau et la phase 3 et 4 correspondent à la repolarisation. Les canaux K^+ jouent un rôle important au niveau de la phase de repolarisation.

La biologie moléculaire des canaux K^+ de la membrane sarcolemmale des cellules cardiaques a fait beaucoup de progrès au cours des dernières années (Shieh et al., 2000). Une classification très détaillée de ces canaux est maintenant connue. Voici un aperçu général de la classification des canaux K^+ responsables des différents courants présents dans un potentiel d'action cardiaque.

Canaux K^+ voltage-dépendants

Les canaux K^+ voltage-dépendants sont activés par un changements de voltage au niveau de la membrane sarcolemmale. Ce changement de potentiel membranaire est dû à l'ouverture et la fermeture des canaux Na^+ qui correspond à la phase de montée du PA (phase 0). Les canaux K^+ participent ensuite à la repolarisation (Boyett, 1986).

canaux K^+ « transient outward »

L'ouverture des canaux K^+ de type « transient outward » (I_{TO}) contribuent à la phase de repolarisation rapide (phase 1) du potentiel d'action. Il existe deux types de courants I_{TO} soit I_{TO1} qui est indépendant au Ca^{2+} et sensible à la 4-AP et I_{TO2} qui est dépendant au Ca^{2+} et insensible à la 4-AP (Kenyon et al., 1979; Coraboeuf et al., 1982).

canaux K^+ « delayed rectifier »

La phase de repolarisation rapide est suivie par un plateau (phase 2) qui est principalement dû au canaux K^+ « delayed rectifier ». Il existe trois type de canaux K^+ « delayed rectifier » soit les IK_r (« rapid delayed rectifier ») , les IK_s (« slow delayed rectifier ») et les IK_{ur} (« ultra-rapid delayed rectifier »). Le courant IK_r est aussi impliqué dans les phases finales de repolarisation soit la phase 3 et 4 (Tristani-Firouzi et al., 2001).

canaux K^+ « leak »

Les canaux K^+ « leak » contribuent eux aussi à la phase 3 et 4 de repolarisation. I_{leak} et IK_{ur} contrent le courant calcique dépolarisant provenant des canaux calcique de type L (Tristani-Firouzi et al., 2001).

Canaux K^+ dépendants du voltage et de ligands

Les canaux K^+ dépendants du voltage et de ligands sont activés, comme leur nom l'indique, par un changement de voltage et leur activité peut être modulée par la liaison d'un ligand à un récepteur spécifique extra ou intracellulaire ou à un site allostérique sur le complexe protéique pour former le canal fonctionnel (tétra ou octamère).

canaux K^+ « inward rectifier »

Les canaux K^+ « inward rectifier » (IK_1) participent également aux phases terminales de repolarisation (phase 3 et 4). La rectification de IK_1 est dû à la présence de Mg^{2+} intracellulaire (Martin et al., 1995). Dans la plupart des cellules cardiaques, IK_1 détermine le potentiel de repos membranaire. Les cellules rythmogènes du cœur possède un type différent de canaux K^+ « inward rectifier ». C'est un courant IK_{ACh} qui est activé par l'acétylcholine (Wickman et al., 1994).

Canaux K^+ modulés par ligands endogènes

La plupart des myocytes cardiaques expriment également un canal K^+ « inward rectifier » de type IK_{ATP} . Ce courant est inhibé par de l'ATP intracellulaire (Noma et al., 1985, Barry et al., 1996).

Autres canaux K^+ des membranes de surface des cellules de mammifères

Les canaux K^+ ne jouent pas seulement un rôle au niveau cardiaque. Plusieurs autres canaux K^+ existe et sont exprimés dans différentes parties du corps de l'humain et également dans d'autres espèces. Ces différents canaux K^+ participent activement dans la régulation de nombreux processus de signalisation cellulaire tant dans des cellules excitables que dans les cellules non-excitables (C'est-à-dire qui ne génèrent pas de potentiel d'action). En fait plus de 50 gènes différents codent pour des canaux K^+ humains et pas moins de 200 gènes codent pour des canaux K^+ qui sont exprimés dans d'autres espèces et ont été clonés dans la dernière décennie (Shieh et al., 2000). Voici quelques exemples de différents canaux K^+ importants.

Canaux K^+ activés par le Ca^{2+}

La classe des canaux K^+ activés par le Ca^{2+} comprend trois types de canaux qui requiert une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} pour s'activer. Les BK_{Ca} (« big conductance Ca^{2+} -activated ») sont des canaux de grande conductance activés par le Ca^{2+} . Les IK_{Ca} (« intermediate conductance Ca^{2+} -activated ») et les SK_{Ca} (« small conductance Ca^{2+} -activated ») font partie également de cette classe mais ils ont des conductances intermédiaires et petites respectivement. Les BK_{Ca} possèdent une très grande conductance (240-260 pS « in vitro » et 100-150 pS « in situ ») (Edwards et al., 1995). C'est canaux sont très abondants dans les muscles lisses vasculaires où ils facilitent l'hyperpolarisation (ou la repolarisation) membranaire en limitant l'entrée de Ca^{2+} par l'inhibition des canaux Ca^{2+} de type L de sorte à permettre aux muscles de relaxer. On les retrouve beaucoup au niveau des cellules endothéliales comme les vaisseaux sanguins par

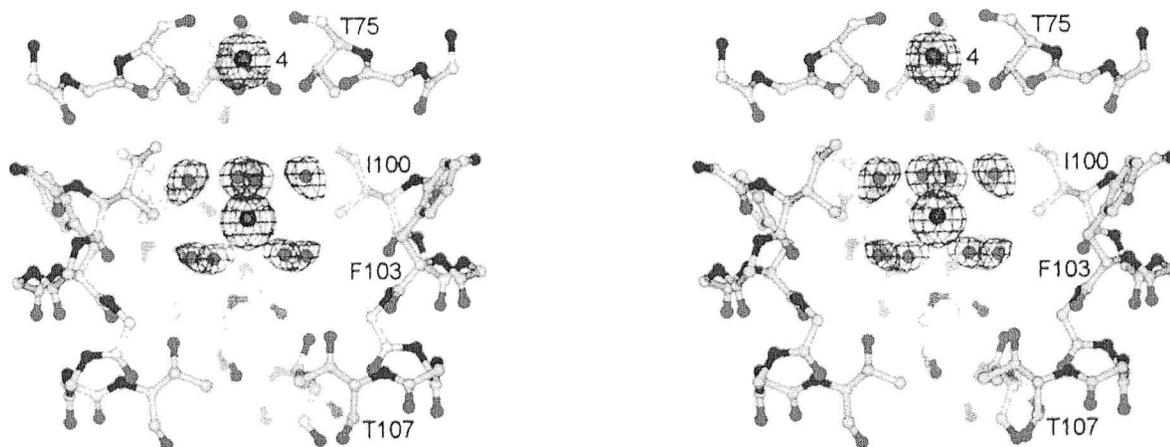
exemple. Les IK_{Ca} ont une conductance intermédiaire (39 pS) et les SK_{Ca} ont une petite conductance (10 pS) (Vogalis et al., 1997).

Vue dynamique sur le fonctionnement des canaux K^+

Au cours des dernières années, la neurobiologie moléculaire a fait un grand pas en avant avec la résolution atomique et moléculaire d'un canal K^+ ($KcsA$) (Doyle et al., 1998). Des chercheurs ont récemment proposé un mécanisme cinétique ainsi qu'une vue dynamique sur le fonctionnement des canaux K^+ (Bernèche et al., 2001; Morais-Cabral et al., 2001; Zhou et al., 2001). De façon générale, le canal K^+ présente sept sites distincts le long de l'axe du pore avec lesquels les ions K^+ vont interagir avec une faible affinité au cours de leur passage dans le canal (Fig. 7A) (Miller, 2001). Le premier site est situé dans la cavité centrale du pore. Le filtre de sélectivité contient quatre sites et les deux derniers sites sont situés à proximité du pore du côté extracellulaire.

La cavité centrale

La cavité centrale correspond à un vestibule situé du côté intracellulaire par rapport au filtre de sélectivité. C'est dans cette cavité que les ions K^+ entrent d'abord avant d'être discriminés des autres cations par le filtre de sélectivité. Cette cavité peut se dilater jusqu'à un diamètre de 10 Å. Elle sert à procurer au ions K^+ un environnement aqueux adéquat de façon à abaisser la barrière énergétique diélectrique de la membrane qui empêche les ions de passer (Doyle et al., 1998; Roux et al., 1999). Huit molécules d' H_2O (cercles rouge) se mettent autour de l'ion K^+ (cercle vert) pour l'hydrater (Fig. 6) (Zhou et al., 2001).



Zhou et al., 2001

Figure 6- Hydratation d'un ion K^+ dans la cavité centrale du pore par huit molécule d'eau disposée en plan polaire.

Le filtre de sélectivité

Le filtre de sélectivité est la structure centrale dont la séquence d'acides aminés est conservée dans tous les types de canaux K^+ . Cette séquence d'acides aminés (TVGYG) provenant de chaque sous-unité est arrangée de façon à ce que leurs groupements carbonyles (COO^-) soient orientés vers l'intérieur du filtre. Cet arrangement permet donc au filtre de sélectivité d'avoir quatre sites où l'ion K^+ peut se lier dans son état déshydraté (Morais-Cabral et al., 2001). Lorsqu'un ion entre dans le filtre de sélectivité il se déshydrate car les groupement COO^- mime son milieu aqueux (Fig. 7B) (Morais-Cabral et al., 2001). Il est à noter que ce filtre est très spécifique aux ions K^+ , un ion Na^+ par exemple ne pourrait pas passer à travers le filtre de sélectivité. Les ion K^+ se déplacent le

long de ce filtre et sont toujours séparés par une molécule d'H₂O. La cavité centrale est toujours occupée par un ion K⁺. Cependant, des 4 sites du filtre de sélectivité et des deux sites situées à la fin du pore du côté extracellulaire, il y en a toujours la moitié qui sont inoccupés, l'autre moitié étant occupée évidemment. Les ions se déplacent dans le filtre de sélectivité en adoptant deux coordinations soit la configuration (1,3) et (2,4) respectivement (Fig. 7B). Il est à noter que les deux configurations adopter par les ions K⁺ sont en parfait équilibre de sorte à ce que les ions qui passent à travers le canal K⁺ ne rencontrent aucune barrière d'énergie (Morais-Cabral et al., 2001). Cette nouvelle description de la conduction cinétique des ions K⁺ dans le filtre de sélectivité et le pore du canal contraste avec les descriptions antérieures de la « single » ou « multiple file diffusion » et les barrières d'énergie énormes que les ions devaient surmonter lors de leur transfert (Hill et al., 1990; Hille, 1992).

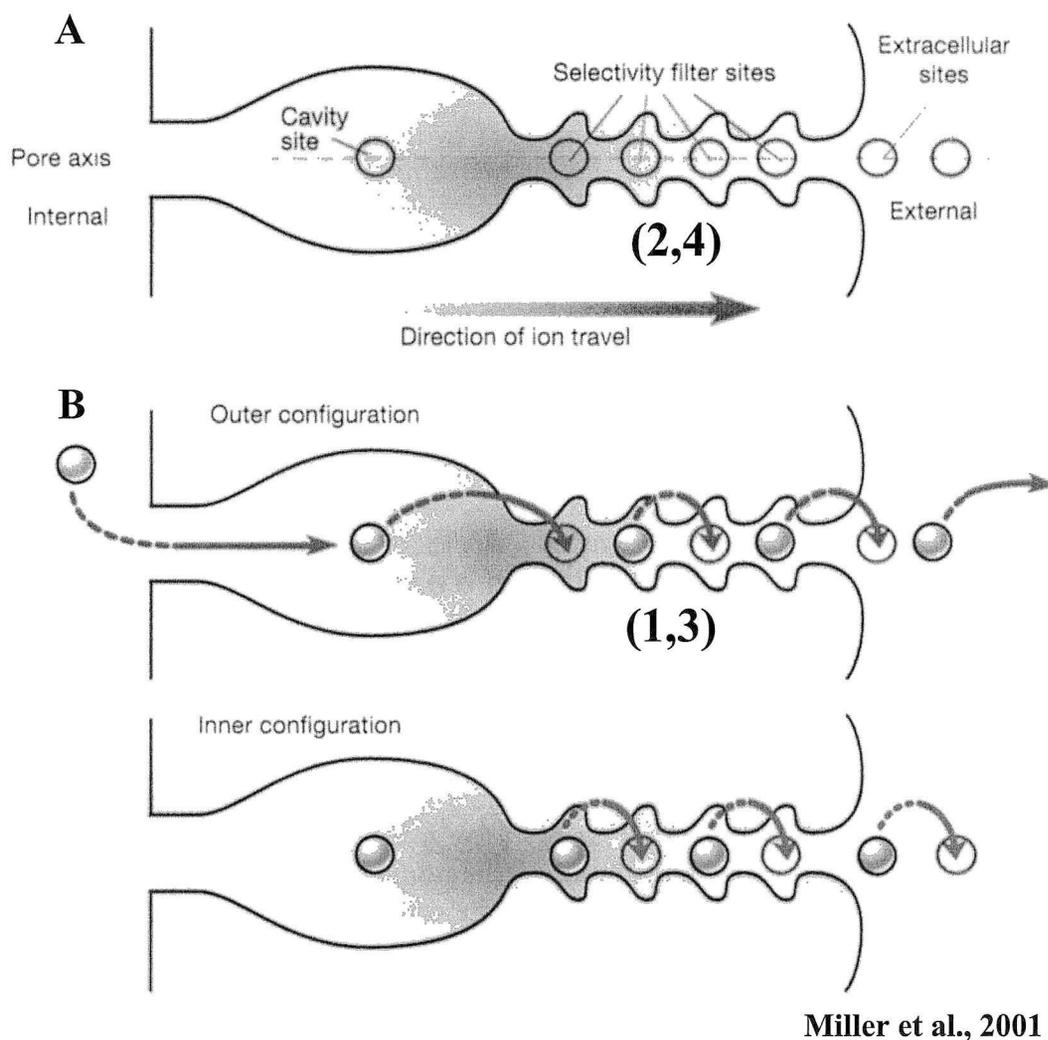


Figure 7- Positions adoptées par les ions K^+ lorsqu'ils passent à travers le filtre de sélectivité.

(A) Lors de leur passage dans le canal K^+ , les ions interagissent avec sept sites distincts le long de l'axe du pore : la cavité centrale du pore, le filtre de sélectivité et deux sites situés à proximité du pore du côté extracellulaire. **(B)** En se déplaçant, les ions K^+ adoptent deux coordinations soit la configuration (1,3) et (2,4) respectivement et ils sont en tout temps séparés par une molécule d' H_2O .

Le canal K⁺ du RS

Au cours des dernières années, le canal K⁺ du RS des muscles squelettiques de lapin (Miller, 1983; Latorre et al., 1983; Miller et al., 1984) et de grenouilles (Labarca et al., 1981) a été beaucoup étudié. Quelques études se sont aussi intéressées sur le canal K⁺ du RS des muscles cardiaques de lapin (Tomlins et al., 1984) et de chien (Tomlins et Williams, 1986; Hill et al., 1990). La caractérisation de ses comportements conducteurs et cinétiques est de nos jours bien connue. De façon générale, les canaux K⁺ du RS sont sélectifs aux cations monovalents (Miller, 1978; Miller et al., 1979; Coronado et al., 1980b; Tomlins et al., 1984; Stein et al., 1989; Liu et al., 1991b). Il a été montré que le canal K⁺ cardiaque canin pouvait transporter du Tl > NH₄ > Cs > K ≥ Rb > Na > Li (Hill, Jr. et al., 1989). Plusieurs groupes ont également identifié un état sous-conducteur à ce canal (Hill et al., 1989; Hill et al., 1990; Liu et al., 1991a). Les canaux K⁺ du RS ont aussi un comportement voltage-dépendant. La probabilité d'ouverture (P_o) de ces canaux est plus élevée lorsque le potentiel électrique du côté cytoplasmique est positif par rapport au côté luminal (Miller, 1978; Labarca et al., 1980; Tomlins et al., 1984; Hirashima et al., 1991; Hill et al., 1990). Aussi, il a été montré que le courant potassique passant dans le canal K⁺ est bloqué de façon compétitive par de nombreux cations divalents (Miller, 1978), par le Cs⁺ (Coronado et al., 1979; Coronado et al., 1980a) et par les ammoniums quaternaires (Coronado et al., 1980a, 1982; Miller, 1982). La 4-aminopyridine a aussi été rapportée comme bloqueur de ce canal (Liu et al., 1998).

Contexte, but et objectifs spécifiques du projet

Contexte

Dans le cœur humain, le couplage excitation-contraction est principalement contrôlé par le mécanisme appelé CICR. (Fabiato, 1989). Le canal Ca^{2+} du RS provenant des muscles striés est connu comme étant le RyR. C'est un canal de type « Ca^{2+} release channel » et il a été étudié en détails par plusieurs groupes dans le passé (Franzini-Armstrong et al., 1997; Sutko et al., 1997). Notre laboratoire a publié récemment les caractéristiques fonctionnelles de l'isoforme RyR₂ d'un canal de type « Ca^{2+} release channel » présent dans les cellules atriales humaines (Côté et al., 2000). Il a été proposé qu'une inhibition de la libération rapide du Ca^{2+} à l'intérieur des cellules cardiaques pourraient avoir lieu en bloquant le mouvement des ions K^+ et Cl^- à travers la membrane du RS (Kargacin et al., 2000; Dods et al., 2001). Très peu d'information est disponible actuellement sur la pharmacologie ainsi que l'identité moléculaire des canaux K^+ du RS cardiaque ou des muscles squelettiques (Hill et al., 1989; Liu et al., 1991a; Picher et al., 1997). À notre connaissance, cette étude est l'une des premières qui tente d'établir le profil pharmacologique des canaux K^+ du RS cardiaque humain à partir de fractions atriales enrichies. Paradoxalement, la biologie moléculaire des canaux K^+ cardiaque de la membrane sarcolemmale a fait beaucoup de progrès au cours des dernières années (Shieh et al., 2000). Différents canaux IK^+ provenant des membranes de surface ont été clonés et exprimés dans des systèmes hétérologues. Plus de 60 sous-unités des canaux K^+ sont maintenant clonées (Snyders D J et al., 1999). D'un autre côté, l'identité moléculaire ainsi que la pharmacologie des canaux IK^+ des membranes intracellulaires

sont pratiquement inconnus. Quelques progrès ont été fait récemment sur l'identification de gènes potentiels codant pour des canaux Cl^- intracellulaires (Berrymann et al., 2000).

But

Puisque les propriétés biophysiques et électrophysiologiques des canaux K^+ du RS ont été relativement bien décrites dans le passé au niveau des muscles squelettiques (Coronado et al., 1980a; Hirashima et al., 1991), des myocytes cardiaques (Hill et al., 1989; Liu et al., 1991a; Shen et al., 1993) et du diaphragme (Picher et al., 1996), le focus de cette étude se tourne maintenant vers une analyse des propriétés pharmacologiques de ces canaux. Une approche moléculaire a été utilisée afin de pouvoir identifier ces canaux K^+ intracellulaire par comparaison avec les canaux K^+ des membranes de surface.

Objectifs spécifiques de mon projet

- Étudier l'inhibition allostérique de différents agents sur la liaison spécifique de la $[\text{H}^3]$ -Ryanodine sur des fractions microsomales enrichies de RS atrial d'humains et d'ovins.
- Reconstituer dans des bicouches lipidiques planes (BLP) les canaux K^+ du RS atrial humain et ovin de façon à caractériser leur propriétés biophysiques.
- Tester et évaluer les effets de différents agents pharmacologiques déjà connus pour interagir avec les canaux K^+ des membranes de surface (IbTX, 4-AP, E-4031 et amiodarone) sur les canaux K^+ du RS de façon à rattacher ce canal à un de ses homologues ou à certains isoformes des canaux K^+ des membranes de surfaces dans l'optique de faciliter leur clonage et donc de révéler, à long terme, leur identité moléculaire.

Matériel et méthodes

Préparation des microvésicules atriales

Les préparations de microvésicules provenant de fractions microsomales brutes ou de fractions enrichies en RS d'oreillettes ont été isolées à partir de tissu auriculaire d'humain ¹ ou d'ovin ². Le protocole utilisé est semblable à celui décrit par notre laboratoire (Decrouy et al., 1996) qui avait été adapté de celui de Meissner et al., 1987. Les tissus humains ont été recueillis lors de la mise en place d'une circulation extracorporelle chez des patients devant subir une intervention chirurgicale cardiaque nécessitant l'arrêt du cœur. La procédure requiert l'incision de l'appendice auriculaire droit et ce fragment d'oreillette au lieu d'être éliminé, est utilisé pour des fins de recherches avec le consentement écrit du patient (CRC 9806 R2). La participation est donc volontaire et l'anonymat du patient est préservé. Environ 50 patients âgés de 55 ans et plus ont participé à ce projet de recherche (2/3 des patients était des hommes et 1/3 était des femmes). Certains patients ont reçu des β -bloqueurs. Les appendices auriculaires recueillis pèse en moyenne 510 ± 40 mg (n = 50). Ils sont lavés dans du « Minimum Essential Medium » (MEM), incubés dans du MEM + 20 % de glycérol et congelés rapidement à l'azote liquide. Les appendices auriculaires sont conservés à -80°C jusqu'à ce que 10 g de tissus soient collectés (environ 20 appendices). Au moment de la préparation des fractions microsomales, les tissus sont lavés et homogénéisés en présence

¹ Protocole de recherche utilisant des appendices auriculaires humains révisé et accepté par le comité de déontologie de la recherche chez l'humain de l'institution (CRC 9806 R2).

² Protocole de recherche utilisant des tissus de mammifères révisé et accepté par le comité d'expérimentation animale de l'institution (CM 018).

d'inhibiteurs de protéases (Tableau 2) dans cinq volume de solution A (voir Tableau 1). L'homogénat est ensuite centrifugé à 9500 rpm (8000 x g) dans un rotor Ti 42.1 pendant 20 minutes de façon à éliminer les débris cellulaires (voir Fig. 8). Le surnageant est filtré à travers deux couches de coton fromage et centrifugé à 33000 rpm (90 000 x g) dans un rotor Ti 42.1 pendant 80 minutes. Le culot ainsi obtenu contient la fraction microsomale brute alors que le surnageant contient la fraction cytosolique diluée qui est éliminée ou conservée pour des essais d'activité enzymatique. Le culot est resuspendu dans la solution B (voir Tableau 1), une solution de haute force ionique afin de dépolymériser les filaments d'actine et de myosine (Meissner, 1975; McKinley et al., 1978) et de haute concentration en sucrose pour conserver l'intégrité des microvésicules lors de la cryocongélation. On obtient notre fraction microsomale brute en homogénéisant le tout au potter.

Les cœurs ovins ont été recueillis à l'abattoir local (Viandes Giroux inc. de East Angus). Les cœurs sont prélevés rapidement après la mort de l'animal et les tissus auriculaires (environ 100 g) sont lavés immédiatement dans une solution tyrode contenant de l'héparine. Les oreillettes sont par la suite isolées et le protocole utilisé pour la préparation de fractions microsomales brutes est identique à celui décrit pour l'humain. Les fractions enrichies en RS sont obtenues par centrifugation isopycniqne sur gradients discontinus de sucrose (25%-40%) de la fraction microsomale brute à 26 000 rpm (80 000 x g) dans un rotor SW 28 pendant 16 heures. Les différentes fractions se séparent alors en fonction de leur aptitude à flotter c'est-à-dire en fonction de leur densité « buoyant density ». Ces différentes fractions (F_I - F_{VI}) sont récupérées aux interfaces des couches de sucrose et les densités de sucroses (w/w) sont respectivement pour les fractions F_I à F_{VI} de

<28 %, 30 %, 33 %, 37 %, 40 % et 43 % (Rousseau et al., 1992). Les différentes fractions sont par la suite récupérées et lavées avec la solution D pour être resédimentées par une centrifugation à 40 000 rpm (130 000 x g) dans un rotor Ti 42.1 pendant 80 minutes. Les culots sont ensuite resuspendus dans de la solution C et les différentes fractions sont congelées rapidement dans l'azote liquide et conservées à -80°C .

Tyrode	Solution A	Solution B	Solution C	Solution D
(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
137 NaCl	300 sucrose	300 sucrose	300 sucrose	400 KCl
13.5 NaHCO ₃	20 K-Hepes	400 KCl	20 Tris-Maleate	5 K-PIPES
5.4 KCl	3 K-EGTA	0.1 MgCl ₂		0.1 K-EGTA
2.7 CaCl ₂	Inhi. de protéase	1 K-EGTA		0.1 MgCl ₂
2.4 NaH ₂ PO ₄		5 K-PIPES		
1.05 MgCl ₂				
pH: 7.4	pH: 7.4	pH: 7.0	pH: 7.0	pH: 7.0

Tableau 1 - Solutions utilisées dans la préparations des fractions microsomales de coeurs canins et ovins.

Inhibiteurs de protéases
50 μM de Pefabloc
1 μM de pepstatine
1 μM de leupeptine
2.4 TUI d'aprotinine
2 mM de DTT
1 μM de vitamine C

Tableau 2 - Cocktail d'inhibiteurs de protéases utilisés dans la préparation des fractions microsomales cardiaques humaines, ovines et canines.

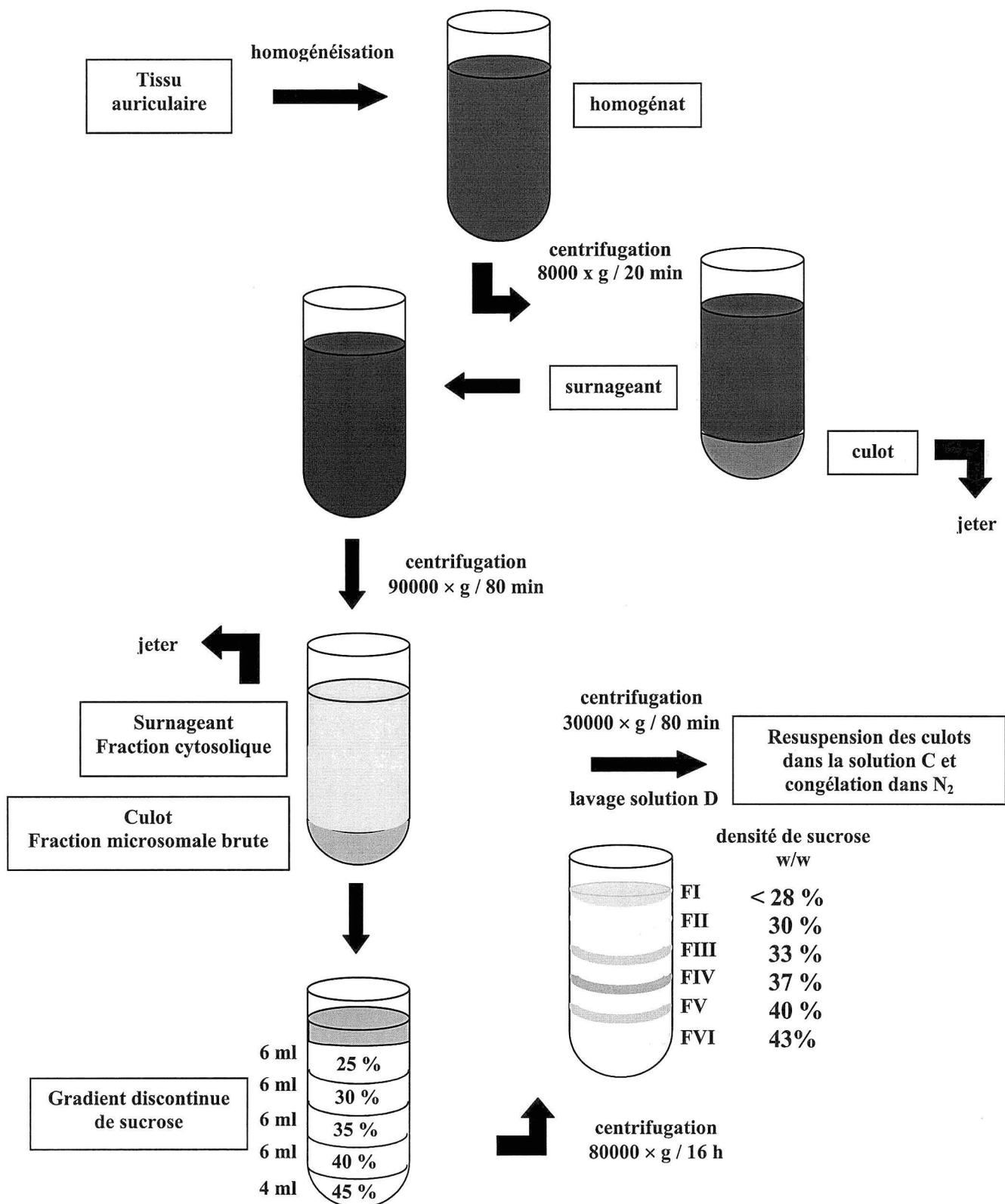


Figure 8- Étapes menant à l'isolement des fractions microsomales.

Caractérisation des microvésicules atriales

Dosage des protéines

Les contenus en protéines des différentes fractions microsomales ont été caractérisés par la méthode du Folin-Ciocalteux (Lowry et al., 1951). Une courbe standard est d'abord obtenue en utilisant l'albumine sérique de bovin (BSA) comme standard. La densité optique de chaque échantillon est déterminée à l'aide d'un spectromètre (longueur d'onde = 700 nm) et la concentration en protéines de chaque fraction microsomale est déterminée reportant sur la courbe standard leur valeur respective de densité optique et en déterminant la concentration de protéines correspondante.

Expérience de liaison à la [³H]-ryanodine

Ensuite, des expériences de liaison à la [³H]-ryanodine ont été effectuées sur les différentes fractions microsomales afin de déterminer quelle fraction est enrichie en membrane du RS jonctionnel. La ryanodine est un alcaloïde provenant de la plante *Ryania Speciosa*. La ryanodine se lie spécifiquement avec une très haute affinité au canal calcique du RS (« Ca²⁺-release channel ») qu'on appelle par le fait même le RyR. Les essais de liaison à la [³H]-ryanodine ont été effectués tel que décrits par Lugnier (Lugnier et al., 1993). Les différentes fractions microsomales (100 µg de protéines par tube) sont lavées dans un tampon non-physiologique appelé tampon de « binding » (voir Tableau 3). Ensuite, ces fractions microsomales sont incubées en présence de 5 nM de [³H]-ryanodine (représente 2 fois la valeur du K_d) et en absence ou présence d'un excès (5 µM) de ryanodine froide (pour la liaison non-spécifique) pendant 90 minutes à 37°C. Après

l'incubation, le mélange est centrifugé à 12 000 rpm (25 000 x g) pendant 10 minutes et on lave les culots avec 150 µl de tampon de binding. Les culots sont recentrifugés à la même vitesse que la première centrifugation et sont resuspendus dans 100 µl de tampon de binding. La liaison à la [³H]-ryanodine est déterminée en mesurant la radioactivité à l'aide d'un compteur β en présence de liquide de scintillation. Finalement, la valeur de la liaison spécifique de la ryanodine est calculée en soustrayant la liaison non-spécifique (obtenues à partir de 5 nM [³H]-ryanodine et en présence de 5 µM de ryanodine froide) de la liaison totale (obtenues à partir de 5 nM [³H]-ryanodine en absence de ryanodine froide).

Tampon de binding
1000 mM NaCl
0.1 mM Na-EGTA
0.15 mM CaCl ₂
5 mM AMP-Na
2 mM DTT
20 mM MOPS
pH : 7.4

Tableau 3 – Composition du tampon de « binding » utilisé lors des expériences de liaison à la [³H]-ryanodine.

Pour les expériences d'inhibition allostérique, des concentrations de 0 à 30 µM de rouge de ruthénium et 0 à 30 mM de magnésium ont été ajoutées lors des incubations. Les courbes d'inhibition ont été générées en utilisant l'équation suivante où « a » représente la valeur asymptotique maximale, « b » représente la pente, « c » représente l'IC₅₀ et « d » représente la valeur asymptotique minimale :

$$y = \frac{(a-d)}{(1+(x/c)^b)} + d$$

Gels de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'étude du profil protéique des différentes fractions a été étudié sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE. Le protocole utilisé pour les expériences de SDS-PAGE est semblable à celui décrit par Laemmli, 1970. Les échantillons de protéines (20 µg de protéines par puit) provenant des différentes fractions microsomales ainsi que de la fraction microsomale brute sont d'abord solubilisés dans du SDS 2% et séparés sur un gel 6% SDS-PAGE en condition réductrice avec un gel concentrateur de 4%. Les gels de polyacrylamide sont montés en utilisant mini protean III (Bio-Rad) et migrent à 200 V pendant environ 1 heure. Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie et éventuellement décolorés à l'aide d'une solution décolorante à base de méthanol (10 %) et d'acide acétique (10 %).

Technique de reconstitution membranaire

Description générale de la méthode

Généralement, les enregistrements électrophysiologiques directs des canaux ioniques provenant de membranes intracellulaires sont extrêmement difficiles à réaliser. La technique de reconstitution membranaire est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appropriées pour l'enregistrement de l'activité et l'étude de la régulation biochimique des canaux ioniques provenant des membranes intracellulaires. Les autres techniques (patch-clamp, double microélectrode, etc...) ne permettent d'enregistrer l'activité des canaux ou des courants ioniques provenant des membranes de surface. La technique de reconstitution membranaire est une méthode consistant à faire fusionner des microvésicules renfermant des canaux ioniques ou à insérer directement des protéines

canal purifiées dans des bicouches lipidiques planes (BLP) artificielles. Cette technique donne accès aux deux côtés des canaux reconstitués. Dans le cas des canaux provenant des membranes de surface, les chambres *cis* et *trans* correspondent respectivement aux côtés extracellulaire et intracellulaire des canaux. Alors que dans le cas des canaux provenant des membranes du RS, les chambres *cis* et *trans* correspondent respectivement aux côtés cytoplasmique et luminal des canaux. La technique offre aussi comme avantage qu'elle n'élimine pas la possibilité d'interactions éventuelles des canaux avec d'autres protéines membranaire ou des microdomaines de phospholipides qui pourraient se situer à proximité des canaux.

Description du montage expérimental

Le montage expérimental comprend d'abord deux chambres expérimentales (*cis* et *trans*) qui communiquent entre elles par un petit orifice d'environ 250 µm de diamètre. Ces deux chambres, formant ce qu'on appelle le dispositif expérimental, seront remplies de solutions salines. Le dispositif expérimental (Fig. 9) est isolé électriquement par une cage de Faraday, servant principalement d'isolation contre les radiations électromagnétiques. Ce dispositif est déposé sur une table antivibratoire sur un coussin d'air comprimé servant à diminuer les interférences avec les vibrations mécaniques. Les deux chambres expérimentales sont reliées aux appareils électroniques par deux électrodes d'Ag/AgCl₂. La chambre *cis* est reliée au préamplificateur alors que la chambre *trans* est mise à terre virtuelle.

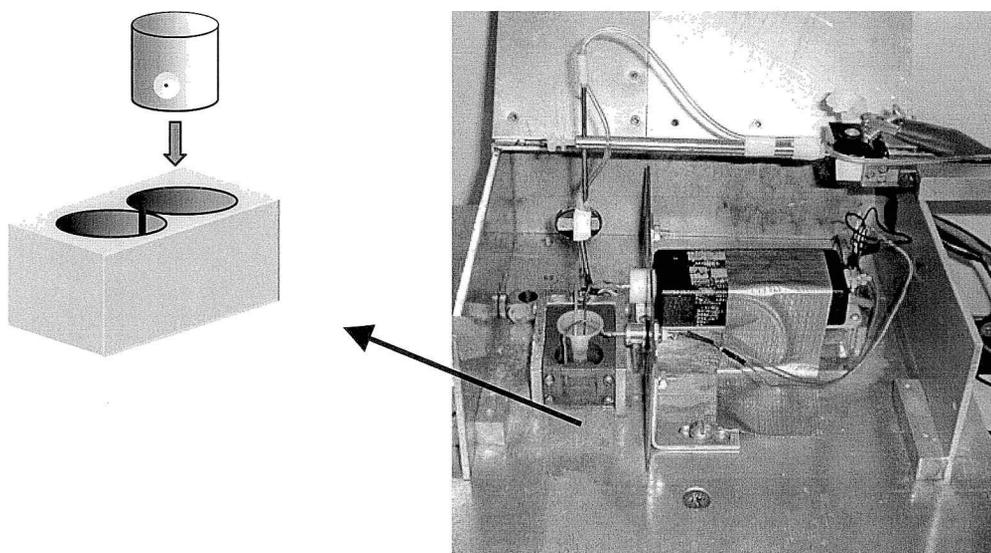


Figure 9- Dispositif expérimental montrant les chambres (*cis* et *trans*) et la tête du préamplificateur.

Composition de la membrane artificielle et prétraitement

La membrane artificielle est tout simplement un film lipidique peint dans l'orifice de 250 μm . La membrane artificielle est composée d'une suspension de 3 phospholipides (Avanti Polar Lipids Inc.), soit le phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylcholine (PC) (Fig. 10). Ces phospholipides sont mis en suspension dans du décane, un solvant organique, dans des rapports de 3 (PE) : 2 (PS) : 1 (PC). Pour que les lipides adhèrent de façon plus efficace au pourtour de l'orifice de 250 μm , celui-ci est préalablement prétraité avec une solution composée du même mélange de phospholipides et des mêmes rapports que ceux qui composent la membrane artificielle sauf que le solvant est du chloroforme (Salvail et al., 1998). Pour prétraiter, une gouttelette de ce prétraitement est déposée sur l'orifice de 250 μm et lorsque le

chloroforme est évaporé, un anneau de phospholipides adhère sur les parois de l'orifice (Fig. 11).

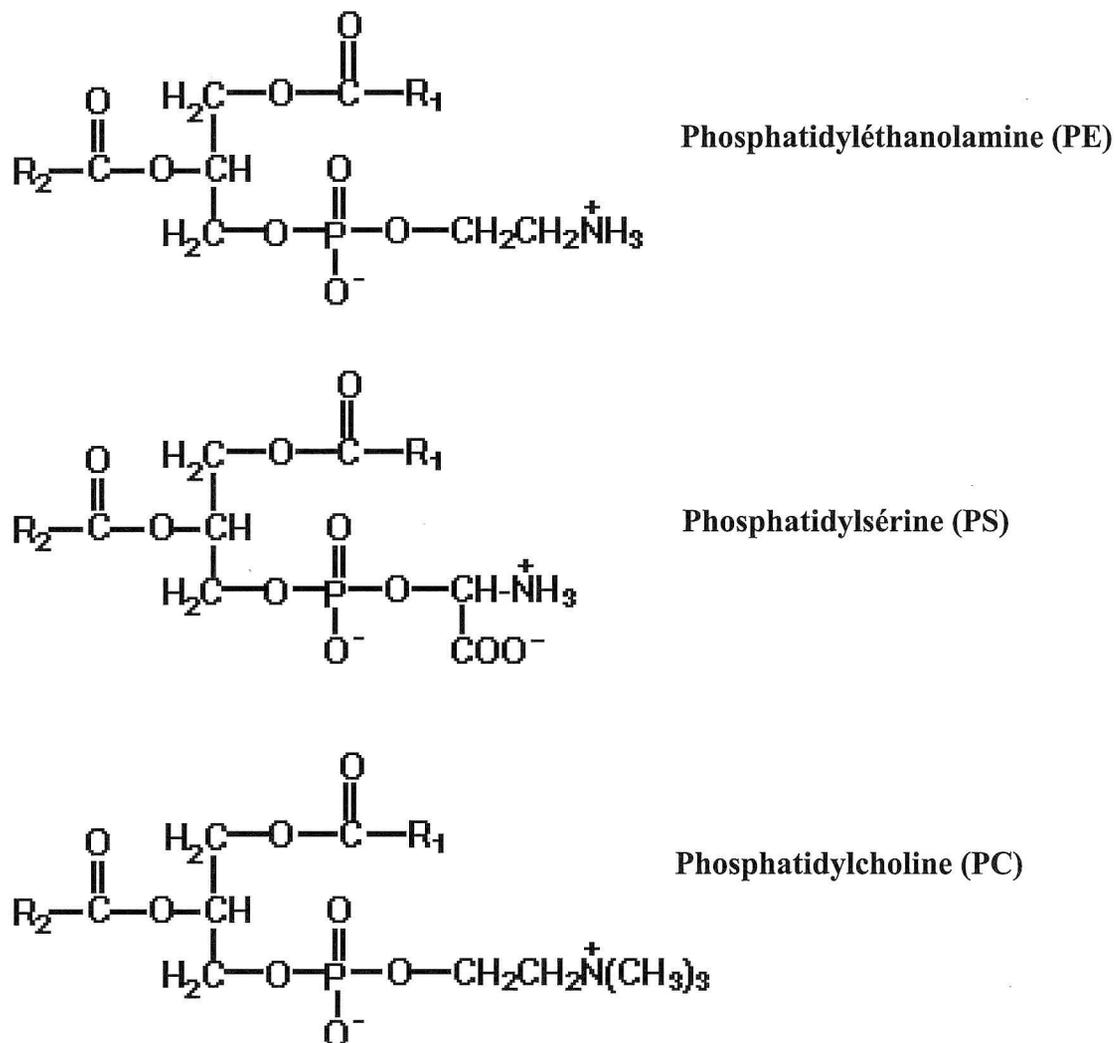


Figure 10- Structures chimiques planes des trois phospholipides utilisés pour les expériences de reconstitution membranaire.

Le PE et le PC sont des phospholipides switterioniques alors que le PS est chargé négativement. Les groupes R₁ et R₂ représente les chaînes aliphatiques (acides gras) des phospholipides. Par exemple en R₁ il peut y avoir estérification d'acides palmitiques, stéariques ou oléiques alors que des acides insaturés sont liés de façon covalente en R₂ (acide arachidonique).

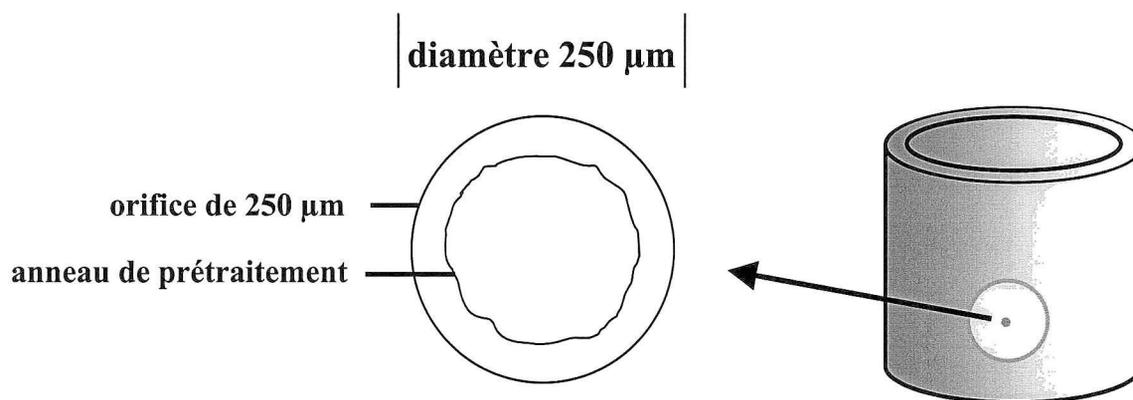


Figure 11- Aspect de l'orifice de 250 μm après prétraitement par un mélange de phospholipides dans du CHCl_3 et évaporation de ce dernier.

Formation de la membrane artificielle et gradient osmotique

Lorsque l'orifice de la chambre *cis* est prétraité, les deux chambres sont remplies d'une solution saline (Tableau 4).

<i>Trans</i>	<i>Cis</i>
50 mM KCl	250 mM KCl
20 mM HEPES	20 mM HEPES
2 mM CaCl_2	2 mM CaCl_2
100 μM EGTA	100 μM EGTA
pH 7.2	pH 7.2

Tableau 4 – Solutions de KCl utilisées dans les chambres expérimentales lors des expériences de reconstitution membranaire.

Dans nos expériences, une solution de KCl est utilisée spécialement pour faire l'étude des canaux K^+ . Avec un pinceau de téflon, un film de notre suspension de phospholipides est peint sur l'orifice de la chambre *cis* jusqu'à l'obtention d'une BLP. La formation de la membrane artificielle est suivie à l'écran de l'oscilloscope en mesurant sa capacité électrique. Le signal est aussi visualisé sur le moniteur vidéo ou l'ordinateur. Le Dagan 3900 mesure également la capacitance de la membrane. Lorsqu'une membrane stable ayant une capacitance membranaire entre 150 et 350 pF est obtenue, un aliquot de solution de KCl 2 M est ajouté dans la chambre *cis* afin de créer un gradient électrochimique entre la chambre *cis* et la chambre *trans* et osmotique (H_2O) entre la chambre *trans* et *cis*. La solution dans la chambre *cis* étant hyperosmotique versus la chambre *trans*, l'eau a tendance à diffuser de la chambre *trans* vers la chambre *cis*. La solution est agitée à l'aide d'un barreau magnétique. Ce phénomène provoque un gonflement des microvésicules absorbées sur la BLP et favorise la fusion des microvésicules à la membrane artificielle (Cohen et al., 1989).

Incorporation et fusion des microvésicules

Lorsque qu'une membrane artificielle stable est obtenue et que notre gradient osmotique est créé, un aliquot de microvésicules est injecté dans la chambre *cis* à proximité de l'orifice de 250 μm à l'aide d'un capillaire relié à une pipette. Le capillaire est monté sur un micromanipulateur de façon à bien pouvoir le positionner vis-à-vis la membrane artificielle lors de l'injection. Normalement entre 3 et 9 μl de microvésicules sont injectés dépendamment de leur concentration. Lorsqu'une microvésicule fusionne avec la BLP, les phospholipides des membranes se réorganisent de façon à ce que la

microvésicule et toutes les composantes membranaires (canaux ioniques, protéines etc...) soient incorporer dans la membrane artificielle (Fig. 12).

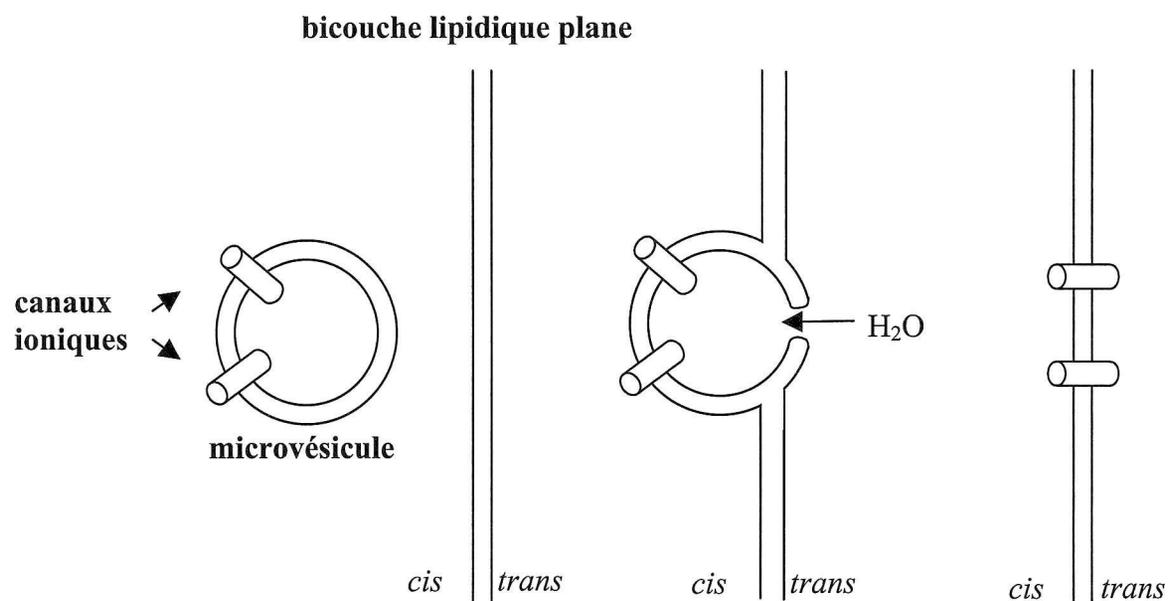


Figure 12- Fusion dans la membrane d'une microvésicule comportant 2 canaux ioniques à la membrane artificielle.

Description de l'appareillage électronique

Suite à la fusion d'une microvésicule dans la membrane artificielle, l'objectif principal de tous les appareils électroniques reliés est de façon générale d'imposer une tension sur la membrane et ensuite de mesurer et d'enregistrer le courant éventuel passant à travers la membrane et/ou les canaux ioniques insérés dans la BLP. Les appareils électroniques constituant le montage expérimental ont tous des fonctions distinctes. Pour faciliter la compréhension de la figure 13, je vais décrire le rôle de chaque pièce dans un ordre logique. Le Dagan 3900 (Axon Instrument inc.) ainsi que le préamplificateur du Dagan 3900, forme sans aucun doute l'appareil principal de tout le montage électronique. Il est spécialement conçu pour les expériences de *patch clamp* mais un module spécial permet son utilisation pour les études de reconstitution membranaire. C'est lui qui fixe le voltage aux bornes de la membrane et il filtre et amplifie une partie du signal. Puisque les courants qu'on mesure sont de l'ordre du pA donc un amplificateur opérationnel est nécessaire dans notre montage. Le courant passe d'abord dans cet amplificateur opérationnel auquel la chambre *cis* est reliée. Cet amplificateur contient une sonde de type FET (« Field Effect Transistor ») à très faible courant de polarisation. La borne positive est mise à la terre alors que la borne négative est reliée à la source du courant. Lorsqu'une microvésicule fusionne dans la membrane artificielle, un courant est généré aux bornes de la membrane. Le système s'arrange pour réinjecter un courant égal mais de signe opposé dans la résistance R_{FB} , placée en contre-réaction entre la borne négative et la sortie de l'amplificateur opérationnel, pour neutraliser la chute de voltage sentie aux bornes de la membrane. On mesure donc le courant « -i » qui est proportionnel au courant circulant à travers le canal. Le système contient également un convertisseur courant-

tension qui traduit le courant en voltage. À la sortie du préamplificateur, le gain correspond au courant multiplié par R_{FB} (10 G Ω) donc à 10 mV/pA. Ce signal est ensuite dirigé vers le Dagan 3900 qui l'amplifie d'un facteur 10 et le filtre (fréquence de coupure de 10 kHz). Un enregistreur de données DAT 75 ES SONY (Unitrade) est branché en parallèle avec le Dagan 3900 et enregistre les signaux bruts (tension et courant) sur une cassette. Le courant est ensuite filtré une autre fois à 1 kHz pour éliminer les bruits de hautes fréquences par un filtre passe-bas (8-poles Bessel, LPF-100, Warner Instrument Corporation) et la tension et le courant sont visualisés sur un oscilloscope. Le courant et la tension passent également par une interface analogue/digitale (Axon Instruments Inc.) afin d'être visualisés sur l'écran d'un ordinateur en même temps que sur l'oscilloscope. Pour des raisons pratiques, un interrupteur à bascule a été inséré dans le circuit pour visualiser à l'oscilloscope et sur l'écran de l'ordinateur les signaux en mode direct ou en mode « replay ».

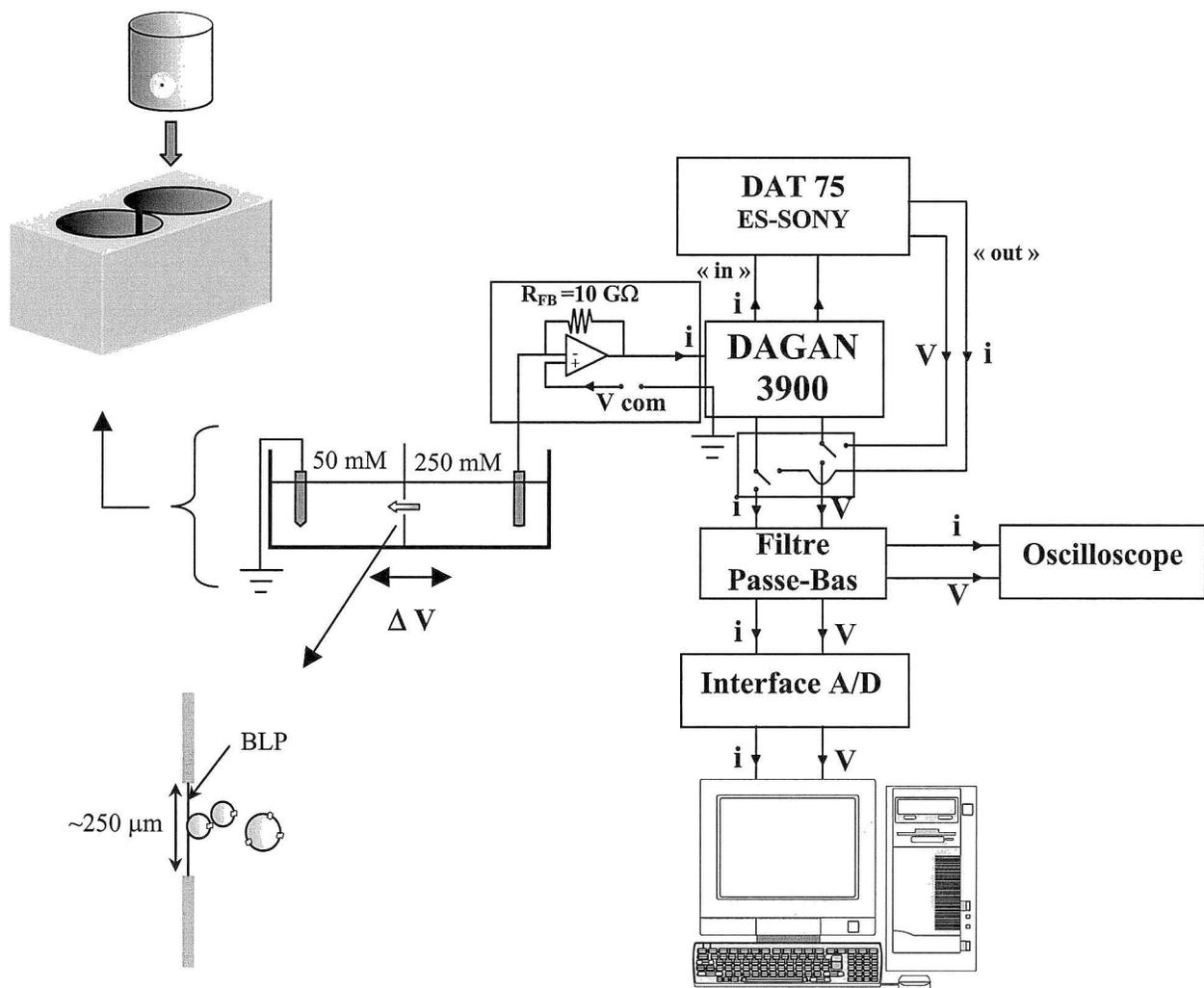


Figure 13- Schéma du montage expérimental utilisé lors des expériences de reconstitution membranaire.

Analyse des signaux

Suite à une fusion, la ligne de zéro courant qui correspond au signal de la membrane artificielle subit un changement d'amplitude (saut de courant) qui témoigne de l'activité électrique de un ou plusieurs canaux ioniques. L'activité du canal est alors enregistrée pour éventuellement en faire l'analyse. Pour faire l'analyse, plusieurs programmes informatiques sont utilisés. Le courant est d'abord digitalisé à l'aide de programmes d'acquisition, AXOTAPE ou plus récemment AXOSCOPE (Axon Instruments Inc.). La digitalisation est effectuée à 4 kHz soit 4 fois la fréquence de coupure du filtre passe-bas (1 kHz). Une fréquence d'échantillonnage de 3 fois la fréquence de coupure est considérée comme étant la valeur minimale pour une digitalisation acceptable afin d'éviter une trop grande distorsion du signal (Colquhoun et al., 1983). Suite à la digitalisation, plusieurs paramètres électrophysiologiques sont analysés:

Courbe courant-voltage

La courbe courant-voltage (i/V) est le premier paramètre électrophysiologique étudié sur le comportement d'un canal ionique. Ces courbes sont obtenues en reportant sur un graphique la valeur du courant unitaire en fonction du voltage dans différentes conditions expérimentales. La valeur de la pente de la courbe i/V correspond à la conductance unitaire (γ) du canal. La conductance unitaire d'un canal nous indique la capacité d'un canal à catalyser le passage des ions à travers la protéine.

Probabilité d'ouverture (Po)

Les canaux ioniques peuvent s'ouvrir et se fermer. Le passage du canal d'un état fermé à un état ouvert ou d'un état ouvert à un état fermé est un processus stochastique c'est-à-dire aléatoire dans le temps. La probabilité d'ouverture (Po) est définie comme étant la fraction du temps total qu'un canal passe dans l'état ouvert sur le temps total de l'enregistrement. La Po est calculée à l'aide d'un programme informatique. Le programme qui a été utilisé est SCA, un programme qui nous a été fourni par le Dr. Mark Nelson de l'Université du Vermont. Le programme construit un histogramme de fréquence où le nombre d'évènements rencontrés pendant l'enregistrement est cumulé pour chacun des niveaux de courant. L'histogramme a généralement la forme d'une double gaussienne et en calculant l'aire sous cette gaussienne, il nous est possible de calculer la probabilité qu'un canal soit dans l'état ouvert, donc la Po, à l'aide de l'équation suivante, où N représente le nombre de canaux, Po la probabilité d'ouverture et « a » les aires sous les gaussiennes de l'histogramme de fréquence.

$$NP_o = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot a(i)}{\sum_{i=0}^n a(i)}$$

Temps moyens d'ouverture et de fermeture

D'autres paramètres électrophysiologiques souvent étudiés sont le temps moyen d'ouverture (τ_o) et le temps moyen de fermeture (τ_f). Comme son nom l'indique, on mesure le temps qu'un canal passe dans son état ouvert (τ_o) et dans son état fermé (τ_f). Ces paramètres sont utiles à connaître lorsqu'on veut établir des modèles cinétiques sur un

canal. La plupart des enregistrements des canaux K^+ consistent en des enregistrements multicanaux donc ce paramètre ne sera pas exploité dans cet ouvrage.

Analyse statistiques

Les résultats sont présentés avec la valeur moyenne \pm l'erreur standard (SEM) où « n » correspond aux nombres de mesures.

Résultats

Caractérisation des fractions microsomales

Liaison spécifique à la [³H]-ryanodine sur les fractions microsomales

Des expériences de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine ont été effectuées sur les différentes fractions atriales ovines pour déterminer 1) leur contenu relatif en récepteurs à la ryanodine et 2) leur sensibilité à deux inhibiteurs des canaux Ca²⁺ de type « Ca²⁺-release channel ». La figure 14 montre les moyennes de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine mesurées sur les fractions microsomales dérivées des cellules atriales ovines. Six fractions microsomales (F_I-F_{VI}) dérivées d'atrium de mouton ont été obtenues en séparant la fraction brute sur un gradient discontinu de sucrose (25 % à 45 %). La ryanodine est un ligand spécifique pour les canaux Ca²⁺ du RS de type « Ca²⁺-release channel » donc par le fait même, un marqueur reconnu pour la membrane du RS (Anderson et al., 1989). L'intégrité des RyRs, au cours de la procédure d'isolation, fut préservée par l'ajout d'inhibiteurs de protéases (Tableau 2) dans les tampons utilisés lors de l'isolation de nos fractions microsomales. Les résultats expérimentaux indiquent que la fraction F_{IV} présente le niveau de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine le plus élevé (698 ± 70 fmol/mg de protéines, n = 3). La fraction F_{IV} est la fraction la plus riche en récepteurs à la ryanodine et doit donc être enrichie en membrane de RS jonctionnel. Elle a donc été utilisée pour toutes les expériences subséquentes de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine et les expériences de reconstitution membranaire. La valeur moyenne du niveau de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine pour la fraction microsomale brute est de 266 fmol / mg de protéines, n = 3).

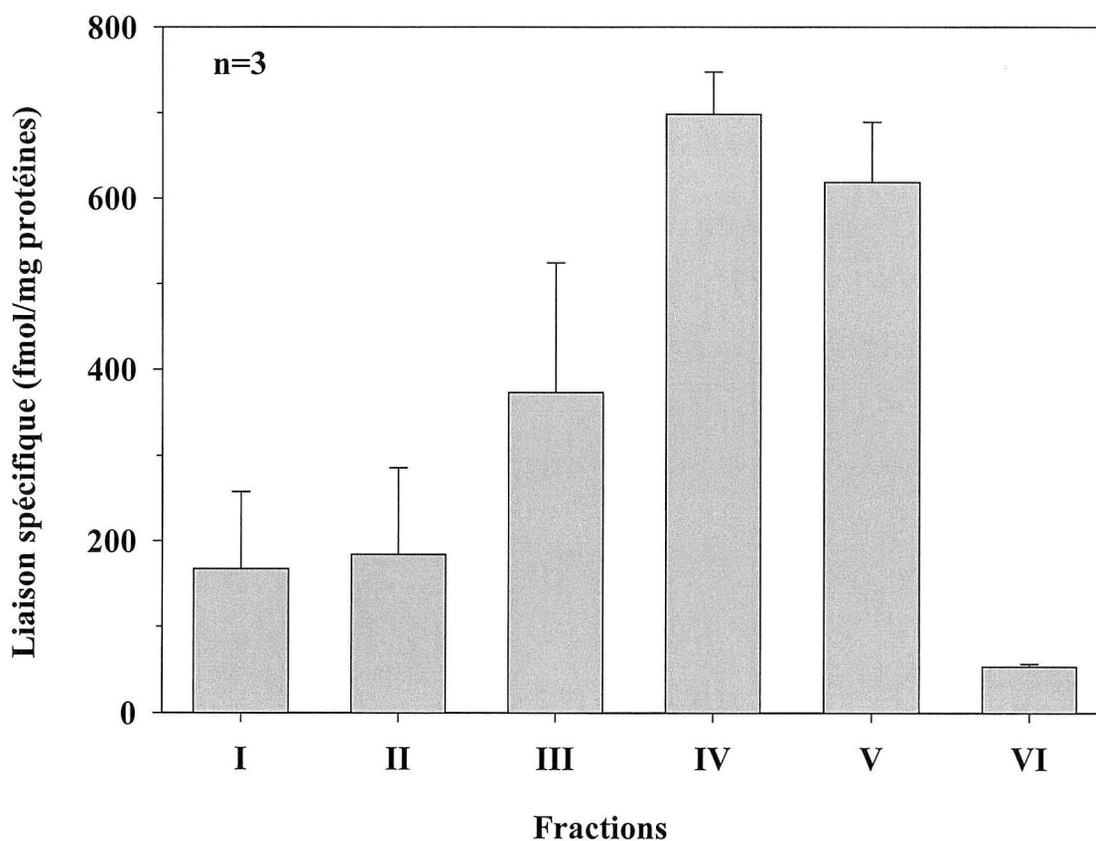


Figure 14 – Liaison spécifique de la [^3H]-ryanodine sur les différentes fractions microsomales isolées à partir de la fraction microsomale brute.

La fraction F_I ($\approx 16\%$ sucrose) a été récupérée à partir du haut du gradient. Les fractions F_{II} - F_{VI} correspondent à des densités de sucrose de 30, 33, 37, 40 et 43 % respectivement. Les fractions F_{IV} et F_V sont les fractions présentant le plus haut niveau de [^3H]-ryanodine liée. Les valeurs sont des valeurs moyennes \pm S.E.M. de trois expériences réalisées en duplicata.

Profil protéique des différentes fractions microsomales

Les différentes fractions microsomales ont aussi été soumises à une analyse de type « SDS-PAGE » 10 %, en conditions réductrices dans le but de comparer le profil protéique des différentes fractions. La figure 15 illustre le fait que les six fractions microsomales sont composées de différentes protéines. Toutefois, les fractions F_{III}, F_{IV} et F_V, qui sont enrichies en RyRs comme le démontre la figure 15, présentent un niveau plus élevé de certaines protéines lorsqu'on les compare avec la fraction microsomale brute ou encore les fractions F_I et F_{II} (Fig. 15). Une bande ayant un poids moléculaire de 31 kDa, pourrait correspondre au phospholamban pentamérique retrouvé au niveau ventriculaire (Davis et al., 1990; Cornea et al., 1997; Kadambi et al., 1997) et qui a aussi été identifié auparavant par notre laboratoire sur des préparations atriales d'humains (Decrouy et al., 1996). N.B. D'autres expériences SDS-PAGE ont été réalisées sur des gels de 12 % qui excluent les protéines supérieures 250 kDa mais qui permettent de détecter des protéines inférieures à 31 kDa dont la FKBP12 qui se lie à l'isoforme RyR₂ (Jayaraman et al., 1992). Les fractions F_{III} à F_V présentent également un enrichissement d'une bande protéique d'environ 55 à 58 kDa. Cette bande correspond à une protéine associée à la Ca²⁺Mg²⁺ATPase (SERCA). Ces résultats obtenus sur les différentes fractions microsomales suggèrent donc qu'il est possible d'enrichir la fraction microsomale brute en membranes dérivées du RS atrial.

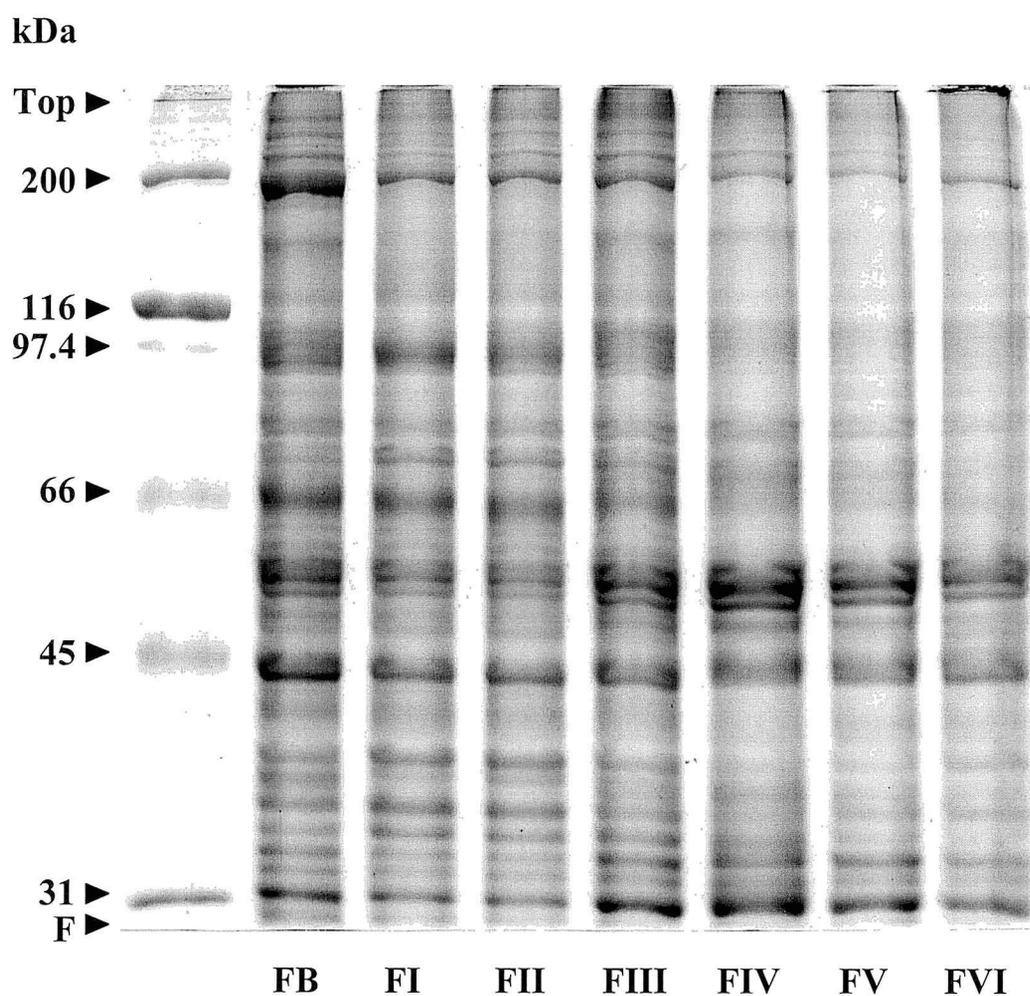


Figure 15 – Profil protéique des différentes fractions analysées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

20 mg de protéines de chaque fraction microsomale (F_I-F_{VI}) et de la fraction microsomale brute (FB) provenant de tissus atriales ovins ont été soumis à une analyse SDS-PAGE 10 % dans des conditions réductrices. Certaines bandes protéiques sont plus intensément marquées, notamment à 31 kDa, et semblent donc être enrichies dans les fractions (F_{III}-F_{VI}).

Effets du rouge de ruthénium sur la liaison à la [³H]-ryanodine

Dû aux quantités élevées de protéines requises pour réaliser les expériences d'inhibition de la liaison spécifique à la [³H]-ryanodine, les fractions microsomales enrichies en RS d'ovins ainsi que les fractions microsomales brutes dérivées des cellules atriales de chiens furent utilisées. Les fractions microsomales brutes dérivées des cellules atriales humaines ont été conservées pour les expériences de reconstitution membranaire. Le rouge de ruthénium fait partie de la famille des polyamines et est connu pour inhiber le « Ca²⁺-release channel » (Ma, 1993; Meissner, 1994; Xu, 1996; Gyorke, 1998; Kargacin, 1998). D'autres de ses congénères soient la spermine, la spermidine et la putrescine ainsi que le rouge de ruthénium lui-même ont été rapportés pour inhiber l'efflux de Ca²⁺ sur des vésicules de RS (Chini et al., 1992; Wolosker et al., 1992). La figure 16 représente les résultats obtenus au cours des expériences d'inhibition de la liaison spécifique à la [³H]-ryanodine induite par des concentrations de l'ordre du micromolaire de rouge de ruthénium (Fig. 16A). Des concentrations de rouge de ruthénium atteignant jusqu'à 30 µM furent nécessaires pour inhiber complètement la liaison spécifique à la [³H]-ryanodine sur les fractions microsomales enrichies en RS d'ovins (Fig. 16A). La régression de la courbe d'inhibition montre un IC₅₀ d'une valeur de 4.11 µM tel que déduit à partir de la valeur utilisée pour réaliser le lissage des données.

Effets du Mg^{2+} sur la liaison à la [3H]-ryanodine

Le Mg^{2+} a aussi eu un effet inhibiteur sur la liaison spécifique à la [3H]-ryanodine autant sur des fractions microsomales enrichies en RS d'ovins (Fig. 16B) que sur des fractions microsomales brutes dérivées de cellules atriales de chiens (Fig. 16C). La figure 16 B et C représente les résultats obtenus au cours des expériences d'inhibition de la liaison spécifique à la [3H]-ryanodine induit par des concentrations de l'ordre du millimolaires de Mg^{2+} (Fig. 16B et C). Des concentrations de Mg^{2+} atteignant 30 mM furent nécessaires pour inhiber presque totalement la liaison spécifique à la [3H]-ryanodine. La régression de la courbe d'inhibition montre une IC_{50} d'une valeur de 9.12 mM pour les expériences menées sur fractions microsomales enrichies en RS d'ovins et de 11.52 mM pour les expériences effectuées sur les fractions microsomales brutes d'atrium de chien.

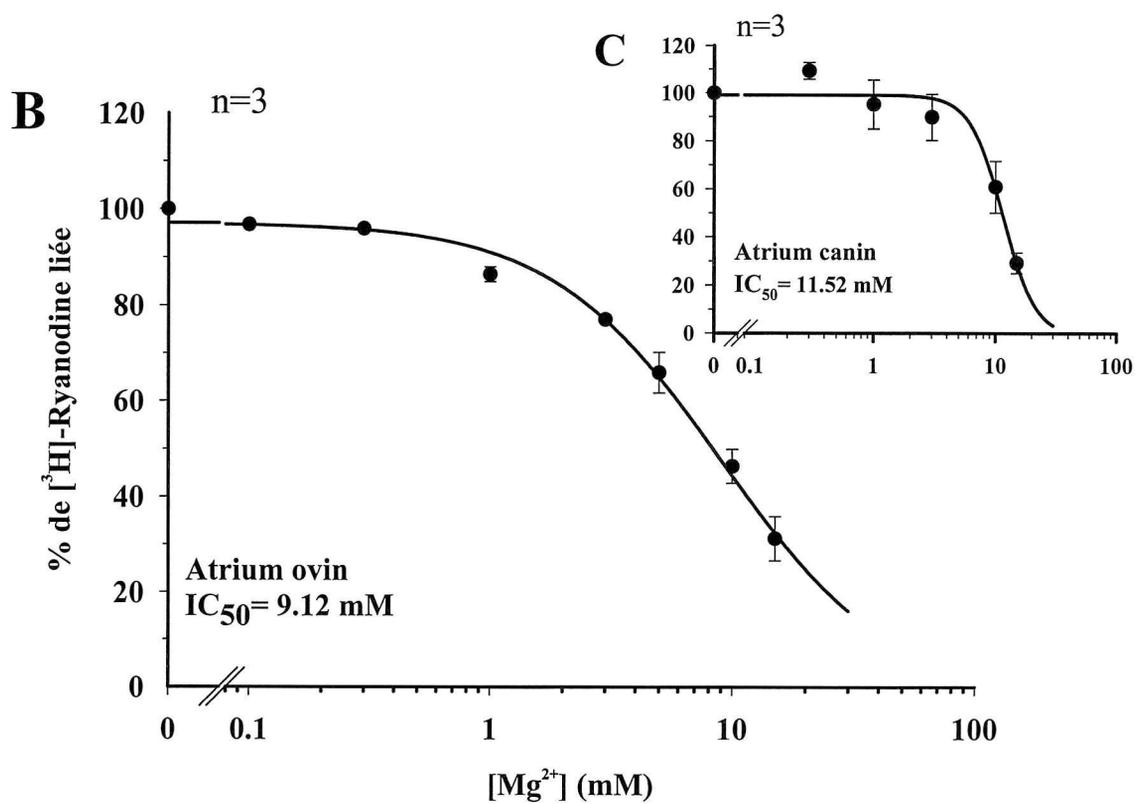
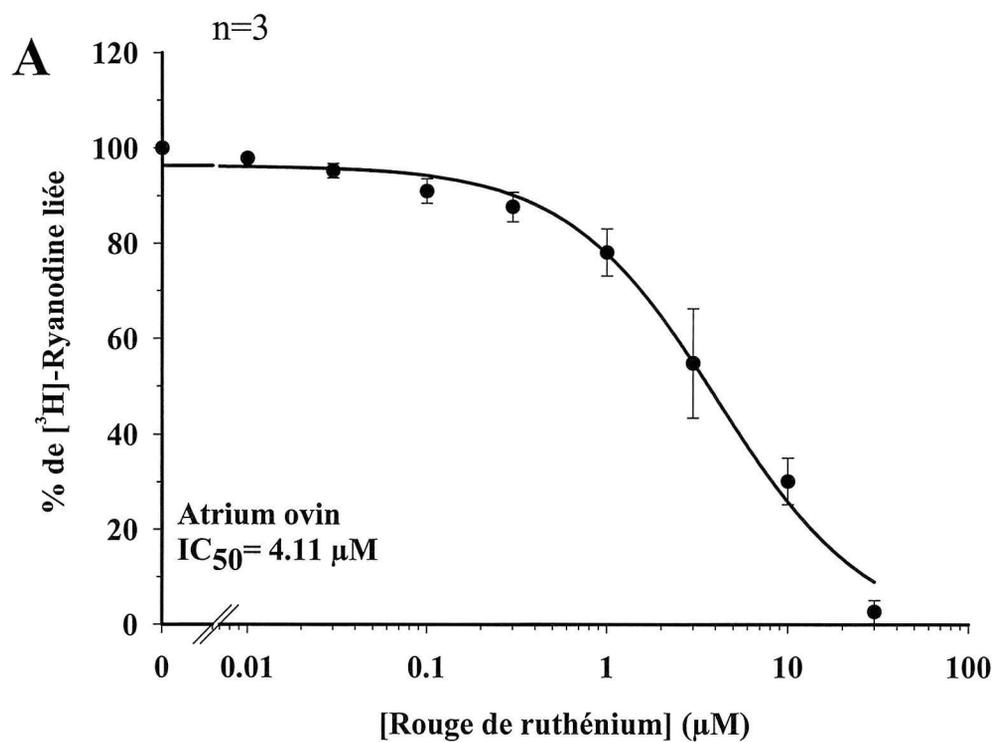


Figure 16 – Courbes d'inhibition de la liaison à la [³H]-ryanodine induit par le rouge de ruthénium et le Mg²⁺.

(A) La liaison spécifique moyenne de [³H]-ryanodine liée est de 560 ± 122 fmol/mg de protéines à 100 %. Le rouge de ruthénium inhibe cette liaison spécifique de la [³H]-ryanodine avec une valeur d'IC₅₀ de $4.11 \mu\text{M}$ sur des fractions microsomales enrichies en RS de cellules atriales ovines. (B) Dans ces expériences, la liaison spécifique de [³H]-ryanodine liée à 100 % est de 672 ± 60 fmol/mg de protéines. Le Mg²⁺ inhibe cette liaison spécifique de la [³H]-ryanodine avec une valeur d'IC₅₀ de 9.12 mM sur des fractions microsomales enrichies en RS de cellules atriales ovines. (C) Sur ces fractions microsomales brutes provenant de cellules atriales de chien, la liaison spécifique de [³H]-ryanodine liée à 100 % est de 147 ± 25 fmol/mg de protéines et une IC₅₀ de 11.52 mM a été calculée pour le Mg²⁺ sur cette liaison ³. Les conditions de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine sont décrites dans la section de matériel et méthodes. Les points expérimentaux représentent la valeur moyenne \pm l'erreur standard (S.E.M.) calculée à partir de trois expériences réalisées en duplicata pour chaque condition expérimentale. Les valeurs d'IC₅₀ sont définies à partir des courbes d'inhibition.

³ La valeur de 147 ± 25 fmol/mg de protéines déterminée sur les fractions microsomales brutes provenant de cellules atriales de chiens est relativement basse mais est donnée à titre comparatif.

Reconstitution membranaire des canaux Cl⁻ du RS ovin

La reconstitution et l'étude du comportement des canaux Cl⁻ natifs du RS ventriculaire et auriculaire cardiaque ont été réalisés dans le passé par plusieurs groupes (Tanifuji et al., 1987; Kourie et al., 1996; Kawano et al., 1999; Kourie, 1999) incluant notre laboratoire (Rousseau, 1989; Decrouy et al., 1995; Decrouy et al., 1996). Ainsi, les caractéristiques biochimiques, pharmacologiques et électrophysiologiques ont été relativement bien décrites.

La figure 17 représente un enregistrement de l'activité du canal Cl⁻ du RS dérivé de cellules atriales ovines. Ce canal a une conductance moyenne de l'ordre de 57 pS dans des conditions asymétriques (50/250 mM KCl, *trans/cis*) et il a un potentiel d'inversion d'environ +22 mV (Fig.17B). Le potentiel d'inversion du courant du canal Cl⁻ du RS est d'environ +20 mV en conditions asymétriques ce qui est une valeur près du E_{Cl} calculé à l'aide de l'équation de Nernst où « R » représente la constante des gaz parfaits (8.314 VC/K mol), « T » la température en Kelvin (295 K), « Z » la valence de l'ion Cl⁻ (-1) et « F » la constante de Faraday (9.648 x 10⁻⁴ C/mol) :

$$E_{Cl} = \frac{RT}{ZF} \frac{\ln[Cl^-]_o}{\ln[Cl^-]_i} = \frac{8.31 \frac{J}{mol \cdot K} \times 295 K}{-(9.65 \times 10^4) \frac{C}{mol}} \times \frac{\ln[50]}{\ln[250]} = +35.8 mV$$

La valeur positive du potentiel d'inversion apparent atteste de la sélectivité anionique du canal Cl⁻ du RS.

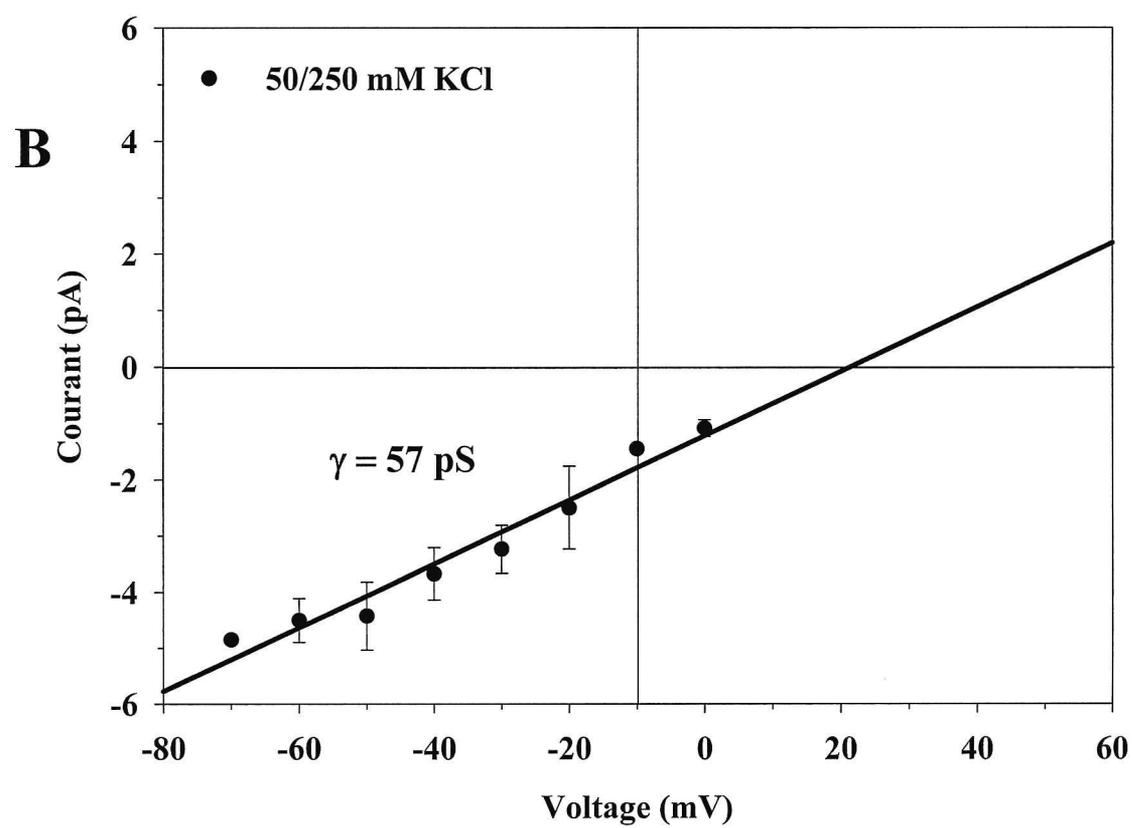
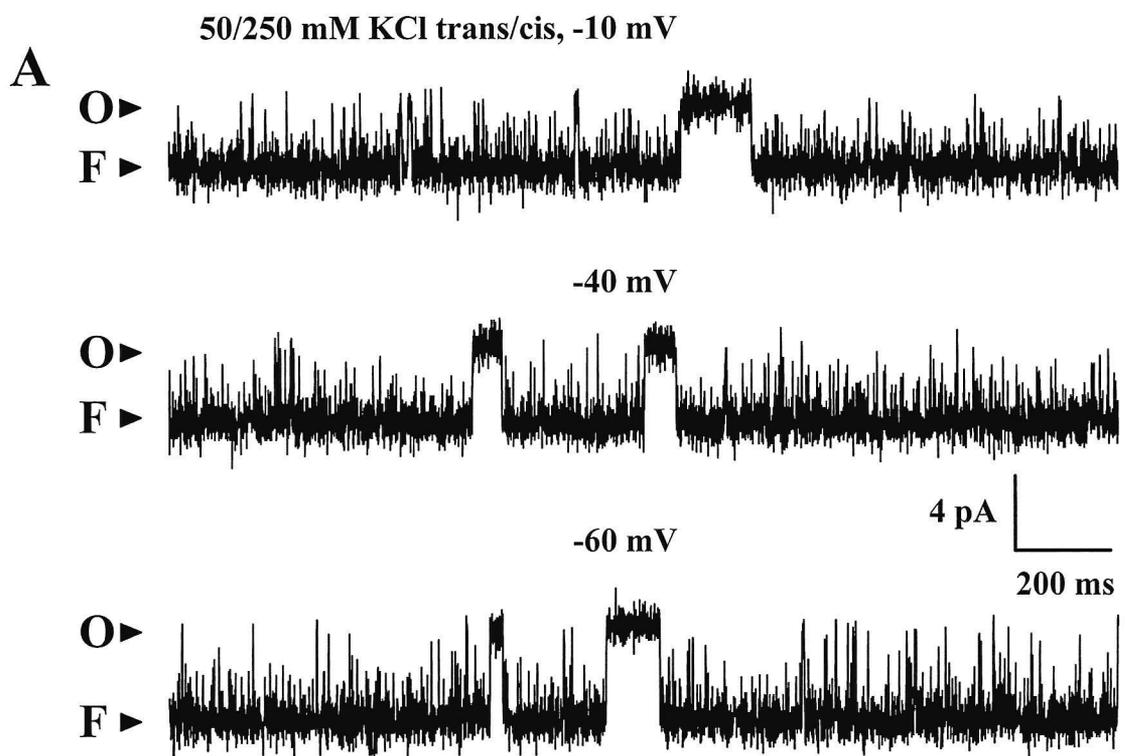


Figure 17 – Caractéristiques fonctionnelles et électrophysiologiques du canal Cl^- dérivé du RS ovin.

Enregistrements typiques d'un canal Cl^- de RS ovin en conditions (50/250 mM KCl, *trans/cis*) pour des valeurs de potentiel de -10 mV, -40 mV et de -60 mV (A). (B) Courbe courant-voltage (i-V) pour ce type de canal Cl^- de RS ovin ($\gamma=57$ pS, $n=3$). État ouvert (\triangleright); État fermé (\blacktriangleright); Conductance (γ).

Reconstitution membranaire des canaux K⁺ du RS humain et ovin

La reconstitution et l'étude du comportement des canaux K⁺ natifs du RS ventriculaire cardiaque et du RS dérivé de plusieurs muscles striés ont déjà été abordées par plusieurs groupes (Coronado et al., 1980a; Hill et al., 1989; Hill et al., 1990) ainsi que par notre laboratoire (Rousseau et al., 1992; Picher et al., 1996; Côté et al., 2001). Toutefois aucune étude détaillée sur les canaux K⁺ du RS atrial humain n'a été réalisée à ce jour. On sait que les caractéristiques biophysiques (conductance, P_o etc...) du canal K⁺ du RS atrial sont similaires avec celles du canal K⁺ du RS ventriculaire cependant, on ignore encore s'il s'agit de la même protéine. La figure 18 présente un exemple d'enregistrement de canal unitaire obtenu dans des conditions asymétriques (50/250 mM KCl *trans/cis*) pour trois différents potentiels sur des microvésicules de RS atrial humain (Fig. 18A) et de RS atrial ovin (Fig. 18B) malgré le fait que plus de 50% des fusions résultent en des enregistrements multicanaux. Le canal K⁺ du RS exhibe des longs évènements d'ouverture et un état sous-conducteur présent à environ 50 % de l'état conducteur complet. Cet état sous-conducteur a déjà été rapporté pour son isoforme dérivé du RS des muscles squelettiques de lapin (Anzai et al., 1994; Picher et al., 1996) et des muscles ventriculaires de chien (Hill et al., 1989). La figure 18C montre que le canal K⁺ du RS humain exhibe une conductance unitaire moyenne de 193 pS (n = 10) alors que le canal K⁺ du RS ovin présente une conductance unitaire moyenne de 185 pS (n = 3). Les valeurs de conductance unitaire sont compatibles avec celles décrites auparavant sur des canaux K⁺ dérivés d'atrium humain (Côté et al., 2001) et de diaphragme de chien (Picher et al., 1996). Le canal K⁺ du RS humain semble présenter un comportement non-ohmique entre les valeurs de -20 mV et +20 mV. Un de mes collègue a aussi observer ce

comportement non-ohmique sur ces mêmes canaux K^+ du RS humain (Côté et al., 2001). On a évoqué la possibilité que cette observation est en relation avec le fait que le canal ne soit pas dans un environnement lipidique adéquat mais nous n'avons pas de preuve formelle. Comme les autres canaux ioniques, les canaux K^+ peuvent s'ouvrir et se fermer. Le passage du canal d'un état fermé à un état ouvert ou d'un état ouvert à un état fermé est un processus stochastique c'est-à-dire aléatoire dans le temps. La P_o représente la fraction du temps total qu'un canal passe dans l'état ouvert divisé par le temps total de l'enregistrement. Les valeurs de P_o pour le canal K^+ du RS humain sont de 0.82, 0.67 et 0.10 pour des valeurs de potentiels de +30, +10 et -10 mV respectivement et ces valeurs sont de 0.75, 0.58 et 0.15 pour des valeurs de potentiels de +30, +10 et -20 mV respectivement pour le canal K^+ du RS ovin. La figure 19A montre que la P_o est dépendante du voltage avec des valeurs de P_o très élevées pour des potentiels positifs. Cependant certains canaux montrent des dépendances au voltage semblables mais déplacées l'une par rapport à l'autres (valeur de $V_{0.5}$ différentes) (Fig. 19B). Ceci laisse sous-entendre qu'un autre paramètre pourrait intervenir dans la dépendance de la P_o au voltage. Pour les deux types de préparations, le potentiel d'inversion du courant du canal K^+ du RS est d'environ -33 mV en conditions asymétriques ce qui est une valeur très près du E_K calculé à l'aide de l'équation de Nernst (-35.8 mV). La valeur négative du potentiel d'inversion apparent atteste de la sélectivité cationique du canal K^+ du RS. Il est à noter que la fusion d'une microvésicule dans la BLP est un processus aléatoire.

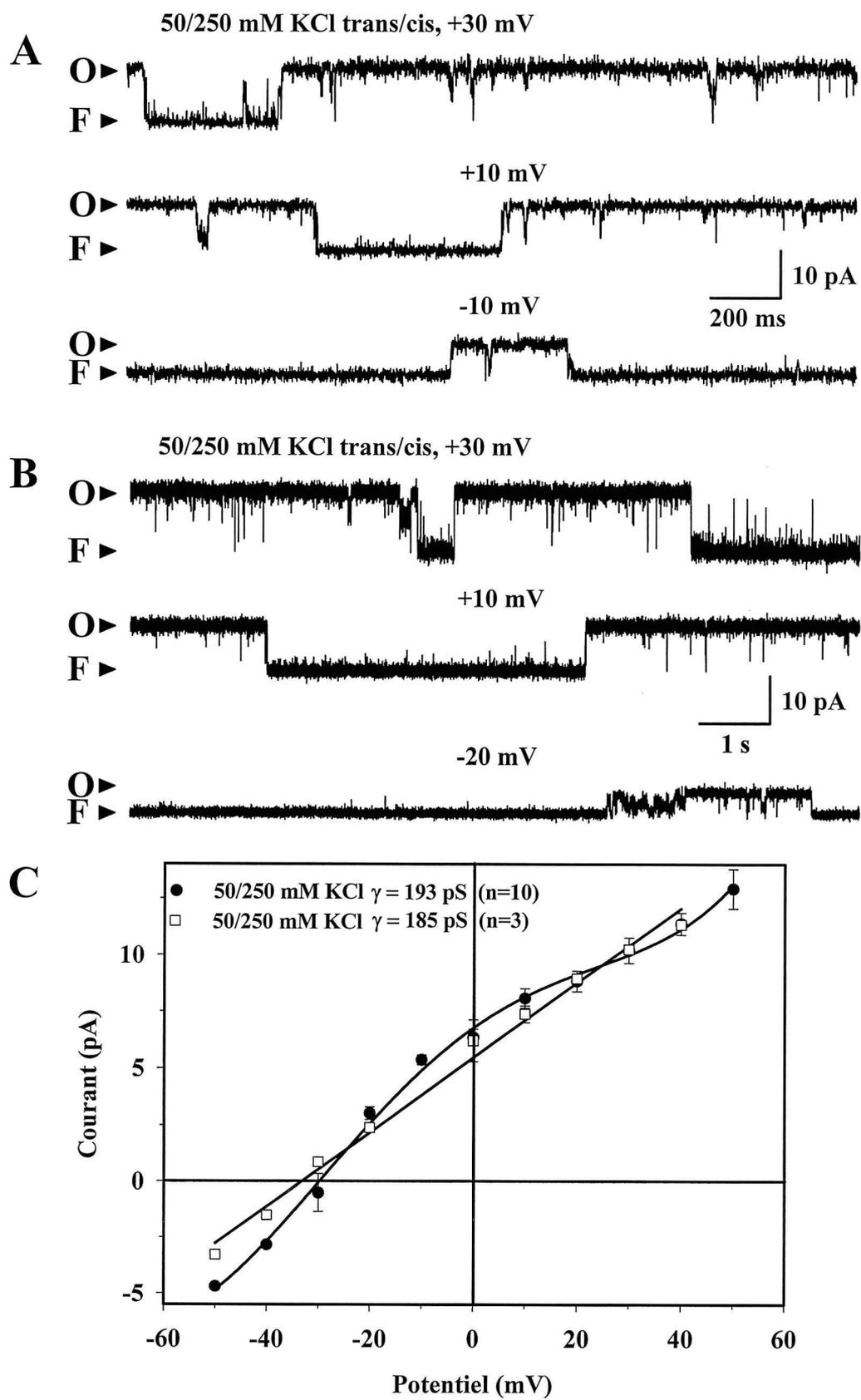


Figure 18 – Caractéristiques électrophysiologiques des canaux K^+ dérivés du RS atriale humain et ovin..

Enregistrements typiques montrant le comportement du canal K^+ du RS dérivé des cellules atriales humaines (**A**) et ovines (**B**) dans des conditions asymétriques (50/250 mM KCl, *trans/cis*) pour trois différents potentiels. La présence d'états sous-conducteurs est notable pour les trois voltages de ces traces. (**C**) Courbes de la relation courant-voltage (i-V) pour ce canal K^+ de RS humain ($\gamma=193$ pS, n=10) et ovin ($\gamma=185$ pS, n=3) dans des conditions asymétriques (50/250 mM KCl, *trans/cis*). Atrium humain (\bullet), Atrium ovin (\square), État ouvert (O \blacktriangleright); État fermé (F \blacktriangleright); Conductance (γ).

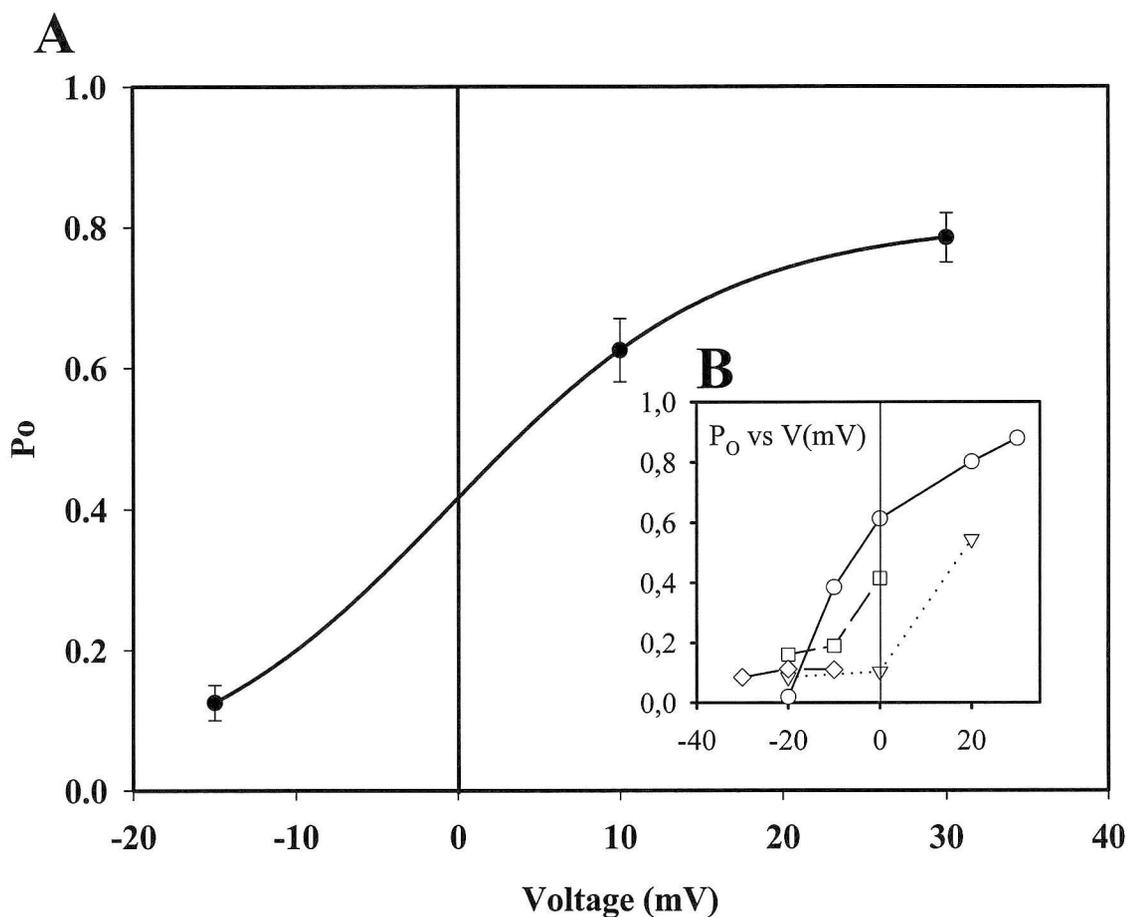


Figure 19 – Courbes de la P_o en fonction du voltage pour des préparations atriales de RS d’humains.

(A) Exemple de P_o en fonction du voltage appliqué à la BLP calculé à partir de trois canaux K^+ du RS auriculaire humain ayant des valeurs de $V_{0,5}$ semblable. (B) P_o en fonction du voltage de trois canaux K^+ du RS atrial humain pour une gamme de potentiel allant de -30 mV à $+30$ mV. Les trois courbes présentent des dépendances au voltage semblables mais déplacées (valeur de $V_{0,5}$ différentes).

Insensibilité des canaux K^+ du RS à des bloqueurs des canaux K^+ du SL

Les canaux K^+ du RS sont insensibles à la 4-AP

La 4-AP est connue pour bloquer les courants de type « transient outward » (IK_{to}) (Bowma et al., 1981). La figure 20 démontre que l'ajout de concentrations atteignant 5 mM de 4-AP du côté cytoplasmique (chambre *cis*) du canal K^+ dérivé du RS d'atrium humain n'a pas d'effet notable sur la conductance du canal K^+ . Il est à noter que de plus petites concentrations de 4-AP n'ont pas d'effet observable sur la conductance également. De plus, la relation courant-voltage n'est pas affectée. La 4-AP est aussi connue pour avoir des effets sur les canaux K^+ de type Shaker, de type Shaw et de type Shal. Le canal K^+ du RS ne correspond sûrement pas à un de ces types de canaux puisque ces canaux possèdent des faibles conductances. Par exemple, le type Shaker possède une conductance d'environ 20 à 50 pS (Kalman et al., 1998). Dans la figure 20, il est à noter que le potentiel d'inversion du canal du RS se trouve à -20 mV au lieu de -40 mV. Ceci est simplement dû au fait que les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes. Pour les expériences menées avec la 4-AP, au lieu d'être en 50/250 mM KCl, *trans/cis*, les conditions expérimentales sont de 100/250 mM KCl, *trans/cis*. N.B. Des conditions ioniques de part et d'autre de la BLP ont été utilisées (50/250, 100/250, 250/250 mM KCl, *trans/cis* pour tester la sélectivité du canal.

L'IbTX n'affecte pas les canaux K⁺ du RS

L'IbTX est connu comme étant un bloqueur sélectif des canaux K⁺ de grande conductance (BK_{Ca}) activés par le Ca²⁺ (Kaczorowski et al., 1996). La figure 21 montre que l'ajout de 100 nM d'IbTX du côté *cis* du canal K⁺ dérivé de cellules atriales humaines n'altère pas la conductance ni la cinétique du canal. Par ailleurs, la présence des états sous-conducteurs n'est pas affectée. Des expériences contrôles réalisées en parallèle ont démontré que des concentrations identiques d'IbTX étaient capables d'inhiber les canaux K⁺ activés par le Ca²⁺ dérivés de trachées de bœuf (Benoît et al., 2001). Malgré le fait que les canaux K⁺ du RS ont une conductance (193 pS) semblable à celle des BK_{Ca} (240-260 pS « in vitro » et 100-150 pS « in situ ») (Edwards et al., 1995), ils sont différents des BK_{Ca} puisqu'ils sont insensibles au Ca²⁺ alors que les BK_{Ca} sont activés par le Ca²⁺ (Benoît et al., 2001).;

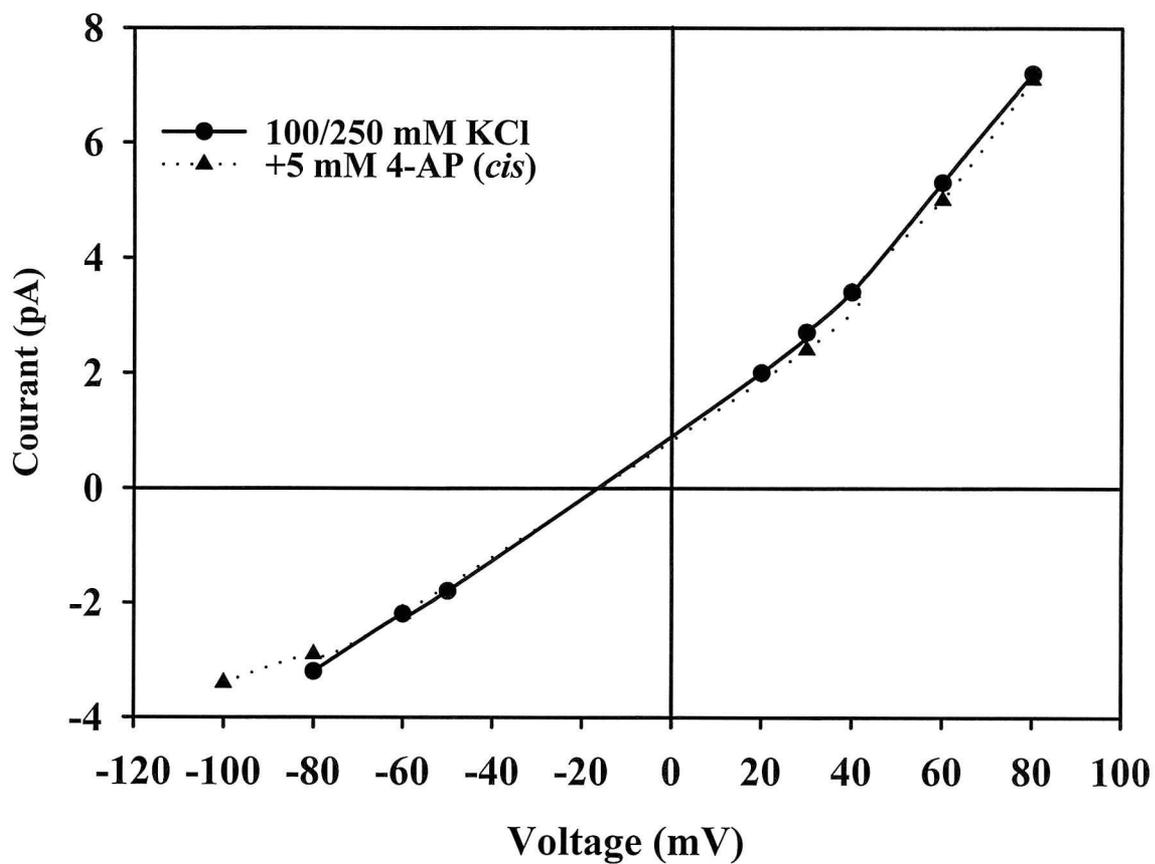


Figure 20 –Le canal K^+ du RS atrial humain est relativement insensible à la 4-AP.

La courbe i/V du canal K^+ atrial humain n'est pas affectée par l'ajout de 5 mM de 4-AP lorsque comparée avec les valeurs expérimentales obtenues en conditions contrôles. L'activité unitaire du canal a été enregistrée dans des conditions asymétriques de tampon de KCl (100/250 mM KCl, *trans/cis*).

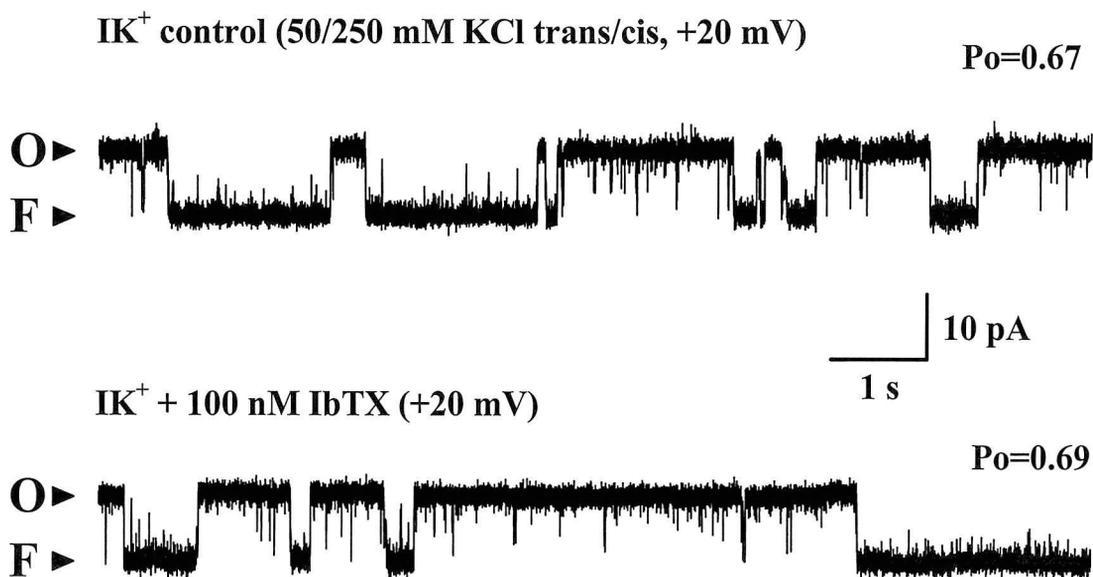


Figure 21 – Le canal K^+ du RS atrial humain n'est pas bloqué par l'IbTX.

Enregistrement typique d'un canal K^+ de RS unitaire en condition contrôle (trace du haut) et en présence de 100 nM d'IbTX (trace du bas) à une valeur de potentiel de +20 mV suite à 20 minutes d'incubation. L'IbTX ne modifie aucunement l'amplitude du courant, la conductance unitaire et ni la valeur de P_o du canal. Noter que les conditions contrôles étaient asymétriques (50/250 mM KCl, *trans/cis*). État ouvert (O▶); État fermé (F▶)

Insensibilité pharmacologique à deux antidysrythmiques

insensibilité au E-4031

Le E-4031 a été rapporté auparavant pour bloquer les canaux K^+ de type « delayed rectifier » (IK_{dr}) (Sanguinetti et al., 1990; Sanguinetti et al., 1991). La figure 22 démontre que 10 μ M de E-4031 ajouté du côté cytoplasmique (chambre *cis*) du canal K^+ dérivé de tissus atriaux ovins n'a pas eu d'effets notables sur la conductance ni sur le comportement de la cinétique de ce canal. De plus les canaux K^+ de type « delayed rectifier » (IK_{dr}) possèdent une conductance d'environ 13 pS (Veldkamp et al., 1993), une valeur de conductance qui ne correspond aucunement avec celle des canaux K^+ du RS (193 pS).

insensibilité à l'amiodarone

L'amiodarone est une drogue faisant partie de la classe III des antidysrythmiques. L'amiodarone est reconnue pour bloquer les courants K^+ de type « delayed rectifier » IK_r et IK_s (Bauman, 1997; Kiehn et al., 1999) et les courants K^+ de type « inward rectifier » IK_1 (Bertran et al., 1997). La figure 23 démontre que l'ajout de 30 μ M d'amiodarone (chambre *cis*) sur le canal K^+ du RS humain n'a pas eu d'effet sur l'amplitude du courant unitaire ni sur la conductance et ni sur la cinétique du canal. Tous les résultats présentés sont représentatifs de $n = 3$ sur les différentes préparations membranaires.

En tenant compte du fait que le canal K^+ du RS n'est pas sensible à des concentrations de l'ordre du micromolaires de Ca^{2+} ou des concentrations de l'ordre du millimolaire d'ATP (Picher et al., 1996) et largement insensible à plusieurs bloqueurs et agents pharmacologiques connus pour interagir avec les canaux K^+ des membranes de surface, il est suggéré que les canaux K^+ du RS représentent des entités distinctes.

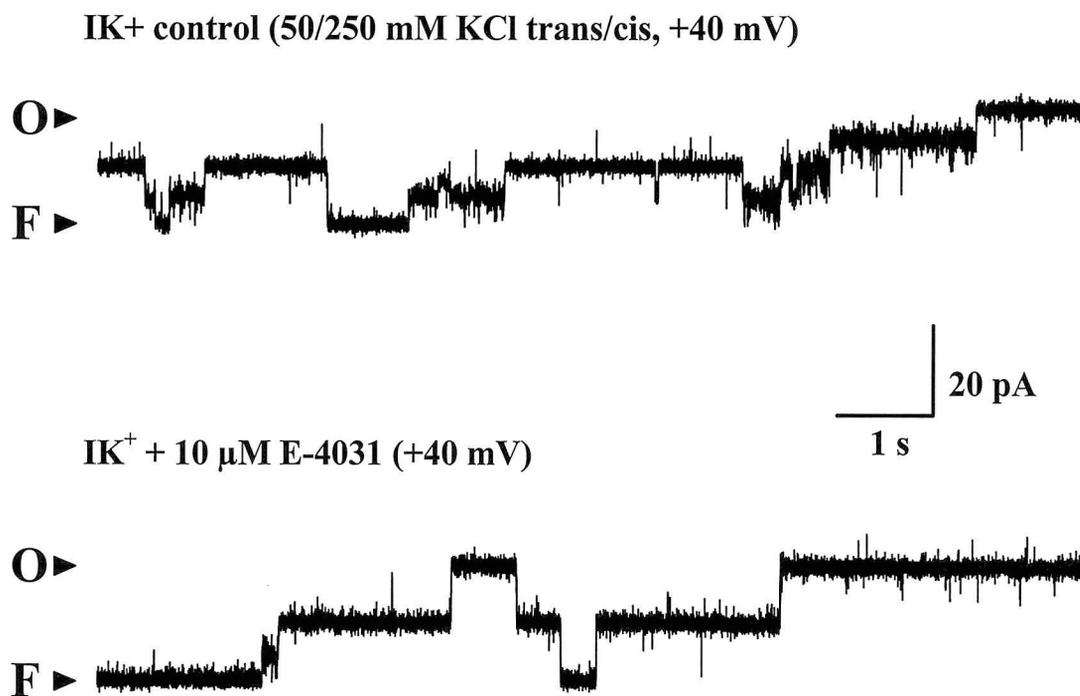


Figure 22 – Le canal K⁺ du RS atrial ovin est insensible au E-4031.

Enregistrement multicanaux typique de deux canaux K⁺ de RS ovin en conditions (50/250 mM KCl, *trans/cis*) contrôle (trace du haut) et en présence de 10 μM d'E-4031 (trace du bas) pour une valeur de potentiel de +40 mV. Le E-4031 ne modifie aucunement l'amplitude du courant, la conductance unitaire ni la cinétique du canal. État ouvert (O▶); État fermé (F▶).

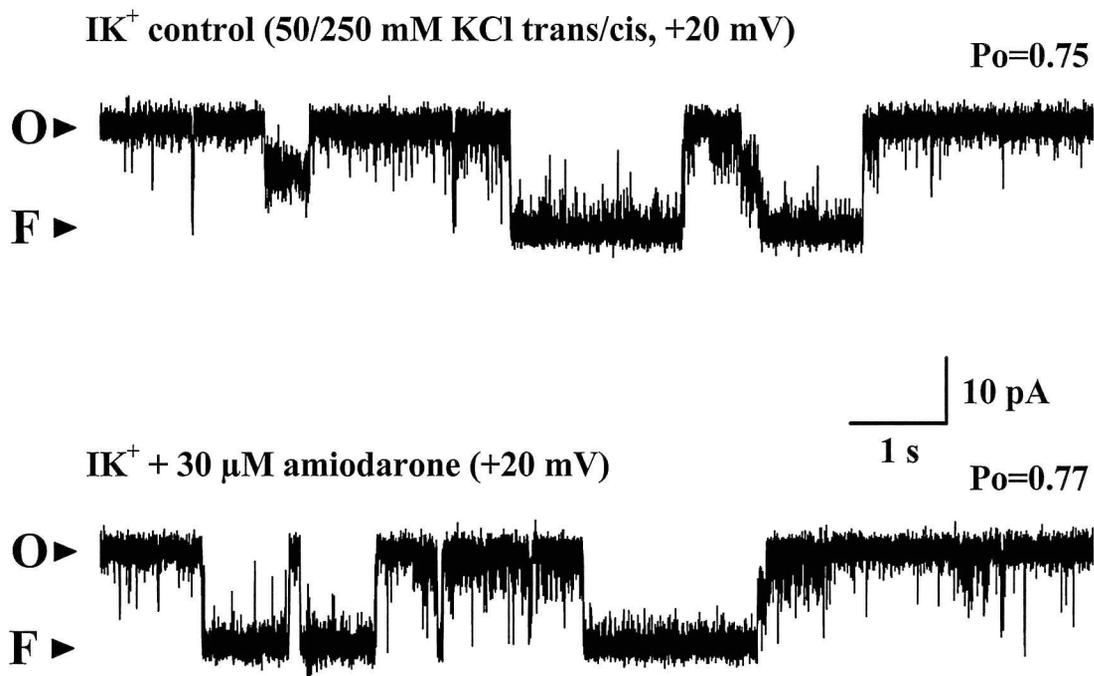


Figure 23 – Le canal K^+ du RS atrial humain est insensible à l’amiodarone.

Enregistrement typique d’un canal K^+ de RS humain en conditions (50/250 mM KCl, *trans/cis*) contrôle (trace du haut) et en présence de 30 μM d’amiodarone (trace du bas) pour une valeur de potentiel de +20 mV. L’amiodarone ne modifie pas l’activité unitaire du canal, l’amplitude du courant, la conductance unitaire ni la P_o du canal. État ouvert (O▶); État fermé (F▶).

Discussion

Il a été récemment proposé dans la littérature que l'inhibition du mouvement des ions K^+ et Cl^- à travers la membrane du RS pourrait diminuer la vitesse de la libération rapide du Ca^{2+} nécessaire à un couplage excitation-contraction efficace (Kargacin et al., 2000 ; Dods et al., 2001). Ce dernier étant proportionnel au taux de changement de la concentration de Ca^{2+} libre intracellulaire (Fabiato, 1983 ; Wier, 1990). Les mouvements de K^+ et de Cl^- aux bornes de la membrane du RS ont été proposés comme étant très importants dans le système de contre-transport de charges de façon à maintenir l'électroneutralité du système. À l'heure actuelle, très peu d'informations sont disponibles sur les propriétés des canaux K^+ du RS dérivé des cellules atriales. Par contre, les propriétés biophysiques des canaux K^+ dérivés des membranes de surface sont relativement bien décrites et connues (pour une revue voir Shieh et al., 2000). En tenant compte de ces faits et de quelques études rapportées sur les canaux K^+ du RS des cellules ventriculaires, la présente étude a été conçue dans le but de caractériser et de comparer les propriétés électro-pharmacologique des canaux K^+ du RS dérivé des cellules atriales de mammifères à celles des canaux K^+ de la membrane de surface. Dans le même ordre d'idée, nous nous sommes intéressés à la pharmacologie des canaux K^+ du RS dans le but de trouver un marqueur pharmacologique avec une affinité suffisante pour d'abord identifier la protéine du canal, éventuellement séquencer cette protéine, produire des sondes moléculaires, identifier l'ADNc, dans le but ultime de purifier le canal K^+ du RS à homogénéité. Cette stratégie pourrait être suivie pour la purification des autres types de canaux provenant des membranes intracellulaires. Suite à la caractérisation des fractions microsomaux enrichies en RyRs (isoforme RyR₂), nos résultats indiquent que les canaux

K^+ du RS sont insensibles à des bloqueurs et à des agents pharmacologiques connus pour interagir avec plusieurs canaux K^+ dérivés des membranes de surface.

Caractérisation des fractions microsomales

La fraction microsomale brute isolée à partir de cellules atriales ovines a été séparée sur un gradient de sucrose discontinu en différentes populations de membrane dans le but d'enrichir certaines populations de vésicules en membranes dérivées du RS jonctionnel et lourd. Les différentes fractions obtenues sont séparées en fonction de leur capacité à flotter « buoyant density » sur un gradient de sucrose discontinu. Les mesures de liaison spécifique à la [3 H]-ryanodine ainsi que les gels d'électrophorèse effectués sur ces différentes fractions microsomales démontrent qu'elles diffèrent au niveau de leur profil protéique. De façon générale, il est maintenant accepté que le Ca^{2+} qui entre dans le cytoplasme d'une cellule cardiaque par l'entremise des DHPRs ou par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} dans son mode inversé, lors d'un PA, déclenche la libération rapide du Ca^{2+} contenu dans le RS et cela contrôle le couplage excitation-contraction dans les cellules cardiaques (Fabiato, 1983 ; Wier, 1990). Le Ca^{2+} contenu dans le RS est libéré par les canaux Ca^{2+} de type « Ca^{2+} -release channel ». Ce type de canal est connu sous le nom de récepteur à la ryanodine (RyR) parce qu'il lie la ryanodine avec une haute affinité et une haute spécificité (Franzini-Armstrong et al., 1997 ; Sutko et al., 1997). De plus il a été démontré par notre laboratoire que le complexe protéique du RS atrial humain, canin et ovin qui lie la ryanodine correspond à l'isoforme RyR₂ (Côté et al., 2001). Par conséquent, la ryanodine est donc utilisée comme un marqueur des préparations membranaire de RS. La fraction F_{IV} présente le plus haut niveau de liaison spécifique à la [3 H]-ryanodine et est donc enrichie en vésicules dérivées de membranes de RS

jonctionnel. Cet enrichissement a également été observé sur des préparations de RS squelettique et ventriculaire (Meissner et al., 1988 ; Anderson et al., 1989) et sur des préparations de RS atrial (Côté et al., 2000). De plus, les fractions F_{III} à F_V présentent l'enrichissement d'une bande d'environ 31 kDa qui correspond à la forme pentamérique du phospholamban préalablement rapportée sur diverses préparations ventriculaire et atriale (Davis et al., 1992) incluant celles dérivées du RS atrial humain (Decrouy et al., 1996). Les fractions F_{III} à F_V présentent également l'enrichissement d'une bande protéique d'environ 55 à 58 kDa qui correspond à une protéine associée à la pompe Ca²⁺Mg²⁺ATPase (SERCA) (Campbell et al., 1981). Des études ont démontré que la pompe Ca²⁺Mg²⁺ATPase sur des muscles squelettiques de lapins correspondait à une bande de l'ordre de 100 kDa (Valente et al., 1990; Rousseau et al., 1991). La présence de cette bande de 100 kDa est observée dans nos préparations mais ne semble pas être enrichie. Puisque le but de ce travail était d'étudier les propriétés fonctionnelles des canaux sélectifs aux ions monovalents K⁺ du RS atrial, la fraction F_{IV} a été utilisée pour les expériences de liaison spécifique à la [³H]-ryanodine et pour les expériences de reconstitution des canaux dans les BLP. Il est à noter que seule la fraction microsomale brute provenant d'atrium ovin a été enrichies en membranes de RS dû au fait que cette procédure exige d'avoir une quantité suffisante de matériel (de l'ordre de plusieurs grammes) et que par ailleurs il était difficile d'obtenir de telles quantités de tissus auriculaires humain. Par conséquent, la fraction microsomale brute dérivée d'atrium humain a été essentiellement utilisée pour les expériences de reconstitution des canaux dans des BLP.

Effet du rouge de ruthénium et du Mg^{2+}

Le rouge de ruthénium et le Mg^{2+} sont deux substances pharmacologiques connus pour interagir avec le canal Ca^{2+} de type « Ca^{2+} release channel » ventriculaire (RyR_2). (Meissner, 1994 ; Kargacin et al., 1998). Les effets du rouge de ruthénium ainsi que ceux du Mg^{2+} sur le « Ca^{2+} -release channel » ont été testés sur la liaison à la [3H]-ryanodine afin de vérifier la sensibilité des $RyRs$ à ces agents et aussi d'évaluer, de façon indirecte, la qualité des préparations microsomaux enrichies en membranes de RS. Le rouge de ruthénium est une molécule qui fait partie de la famille des polyamines et il est utilisée pour caractériser le RyR . Les valeurs des expériences de liaison spécifique démontrent que le rouge de ruthénium a un effet inhibiteur sur la liaison spécifique à la [3H]-ryanodine ($IC_{50} = 4.11 \mu M$). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits auparavant pour le « Ca^{2+} -release channel » dérivé des muscles squelettiques (Ma, 1993) et des cellules ventriculaires cardiaques (Rousseau et al., 1986 ; Kargacin et al., 1998). Il a été clairement démontré que le rouge de ruthénium entre dans le pore du canal et bloque les courants passant à travers le « Ca^{2+} -release channel » du RS des muscles squelettiques et cardiaques. Cependant, dans des expériences contrôles, le rouge de ruthénium, dans des concentrations de l'ordre du micromolaire, n'a eu aucun effet sur le canal K^+ du RS cardiaque et des muscles squelettiques (données non-illustrées).

Les mesures de liaisons spécifiques démontrent également que le Mg^{2+} inhibe la liaison spécifique à la [3H]-ryanodine sur les fractions microsomaux enrichies en membrane de RS atrial d'ovins ($IC_{50} = 9.12 mM$) et sur la fraction microsomale brute canine (11.52 mM). Le Mg^{2+} est un autre modulateur ionique important dans les processus de la libération rapide du Ca^{2+} et le repompage de celui-ci. Le Mg^{2+} déplace la

dépendance au Ca^{2+} de la liaison à la ryanodine vers des concentrations plus élevées comme cela a été démontré pour les muscles squelettiques (Meissner, 1994) et pour les cellules cardiaques (Xu et al., 1996 ; Györke et al., 1998). Ceci est en relation avec le fait que la ryanodine se lie plutôt au canal Ca^{2+} du RS dans son état ouvert alors que le Mg^{2+} tend à faire refermé ce canal. Par ailleurs, il a été montré que le Mg^{2+} modifiait la cinétique des canaux formés par les RyR dérivés du diaphragme canin et reconstitués dans des BLPs (Picher et al., 1997). Il a aussi été montré que le Mg^{2+} a un rôle inhibiteur sur la cinétique de ces canaux Ca^{2+} provenant de RS ventriculaire canin (Rousseau et al., 1986). Ces résultats confirment donc que les RyRs des cellules atriales humaines et ovines sont sensibles au rouge de ruthénium et au Mg^{2+} . De plus, la haute capacité de liaison à la [^3H]-Ryanodine des fractions microsomales enrichies en RS confirme qu'il est possible d'enrichir ces fractions d'un facteur d'environ 3 fois par rapport aux fractions microsomales brutes.

Analyse de la reconstitution des canaux K^+ dans les BLPs

L'analyse des propriétés biophysiques du canal K^+ du RS au niveau unitaire montre que la conductance moyenne est de l'ordre de 193 pS pour des préparations atriales humaines et de 185 pS pour des préparations atriales ovines (Fig. 18C) dans des conditions asymétriques (50/250 mM KCl, *trans/cis*). Le potentiel de zéro-courant du canal, environ -33 mV dans des conditions asymétriques de KCl (50/250 mM KCl, *trans/cis*) est assez près du E_{K} calculé à l'aide de l'équation de Nernst (-35.8 mV). Ce potentiel de zéro-courant (50/250 mM KCl, *trans/cis*) atteste de la sélectivité aux cations monovalents de ce canal autant pour le canal K^+ du RS humain qu'ovin. Les enregistrements électrophysiologiques ainsi que les valeurs de conductance unitaire

obtenues pour ces canaux cationiques non-sélectifs sont similaires à ceux de leurs homologues présents dans le RS des muscles striés (Hill et al., 1989 ; Liu et al., 1991a ; Picher et al., 1996). Les canaux K^+ du RS atrial ont effectivement un comportement voltage-dépendant ; leurs probabilités d'ouverture augmentent lorsque des potentiels dépolarisants sont appliqués à la bicouche. Le comportement voltage-dépendant des canaux K^+ du RS a également été observé sur des préparations atriales de RS humain (Fig. 19B ; Côté et al., 2000). Les trois courbes dans cette figure présentent des dépendances au voltage semblables mais légèrement déplacées sur l'axe du voltage les unes par rapport aux autres. Ceci suggère donc qu'il pourrait exister un autre paramètre important qui interviendrait dans la dépendance de la P_o face au voltage. Lorsqu'il y a un transitoire calcique, il y a mouvement de charges pour contre-balancer le système, soit des protons, soit du Cl^- , soit du K^+ ou probablement un peu des trois. Du fait de sa concentration, le K^+ pourrait avoir le rôle principal. La dépendance au voltage doit être reliée aux variations de voltage que peut générer la membrane du RS.

Paramètres servant à la classification

La classification de canaux ioniques a été établie en fonction de leurs conductances, leurs mécanismes d'activation (voltage-dépendants, ligands dépendants, etc...) ou encore par leurs sensibilités à différents agents pharmacologiques ainsi qu'à certaines toxines (voire la section introduction). Un des objectifs spécifiques de ce projet était donc d'essayer d'établir un « profil pharmacologique » pour les canaux K^+ du RS dérivé de cellules atriales de mammifères en les comparant avec ceux connus pour la famille des canaux K^+ de la membrane sarcolemmale. La recherche d'un marqueur de la protéine du canal K^+ du RS était la première motivation pour éventuellement purifier puis

séquencer cette protéine afin de produire des sondes (anticorps ou sondes polynucléiques) et remonter jusqu'à l'ADNc de cette protéine.

L'amplitude du courant unitaire, la conductance ainsi que le comportement cinétique des canaux K^+ du RS des cellules atriales humaines reconstitués dans des BLPs n'ont pas été affecté par l'addition de 5 mM de 4-AP. Les résultats obtenus dans le présent travail sont contradictoires avec ceux déjà observés et rapportés sur des canaux K^+ de RS dérivé de cellules ventriculaires cardiaques canines où l'effet bloqueur de la 4-AP avait nécessité une concentration de 20 mM (Liu et al., 1998). Dans ce travail, la dose de 4-AP a été limitée à 5 mM, une concentration que l'on considère comme étant une limite maximale pour l'observation d'un effet spécifique de la 4-AP sur les canaux K^+ reconstitués. De plus, du fait que nous recherchions un marqueur spécifique pour notre canal, soit une substance pharmacologique ayant une haute affinité donc idéalement de l'ordre du nM. Notre canal ne correspond donc pas à un canal K^+ de type « transient outward » (IK_{TO}) qui est bloqué par la 4-AP et dont la conductance unitaire est de petite valeur (<1 pS) (Bowma et al., 1981). Nous avons également cherché à comparer ces canaux K^+ du RS avec les BK_{Ca} parce que leur grande conductance (193 pS pour l'humain et 185 pS pour l'ovin) était semblable à celle des BK_{Ca} (100-200 pS) (Salkoff et al., 1992 ; Butler et al., 1993). Néanmoins, le canal du RS est insensible aux variations de Ca^{2+} dans la gamme des [μ M] (0.01 à 10 μ M). L'addition de 100 nM d'IbTX dans la chambre *cis* n'a également pas eu d'effet sur l'amplitude du courant, la conductance ainsi que la P_o du canal K^+ de RS atrial humain. Une autre étude a également démontré que les canaux K^+ du RS des muscles squelettiques et de RS ventriculaire canin étaient insensibles aux variations de concentrations de Ca^{2+} variant de 0.1 μ M à 1 mM et

insensibles à la charybdotoxine (Chabot, 1993). La charybdotoxine est une toxine qui comme l'IbTX (Kaczorowski et al., 1996) bloque sélectivement les canaux K^+ de grande conductance activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}) (Corompt et al., 1998). Il est à noter que les BK_{Ca} ne sont pas exprimés par les cellules du myocarde.

Le canal K^+ du RS dérivé des cellules atriales humaines en condition contrôle (50/250 mM KCl, *trans/cis*) est également insensible à l'ajout de substances antidysrythmiques comme le E-4031 et l'amiodarone dans la chambre *cis*. Le E-4031 est un antidysrythmique connu pour inhiber les canaux K^+ de la membrane de surface de type « delayed rectifier » IK_{dr} (Follmer et al., 1990; Carmeliet, 1992). L'amiodarone est également un antidysrythmique connu pour avoir des effets inhibiteurs sur les courants K^+ de type « delayed rectifier » IK_r et IK_s (Bauman, 1997; Kiehn et al., 1999) et les courants K^+ de type « inward rectifier » IK_1 (Bertran et al., 1997). L'amiodarone est très utilisé en clinique au niveau des arythmies ventriculaires et auriculaires (Piras et al., 1981).

Même s'ils sont voltage-dépendants, les canaux K^+ du RS se distinguent nettement des canaux K^+ de type « Shaker », de type « Shaw » ou de type « Shal » par leur conductance unitaire élevée et le fait qu'il ne s'inactivent pas. Les canaux K^+ de type « Shaker », « Shaw » et « Shal » ont des conductances de l'ordre de 10-20 pS (Salkoff et al., 1992; Butler et al., 1993). Il a aussi été démontré que les canaux K^+ du RS des muscles squelettiques et de RS ventriculaire canin ne sont pas phosphorylés par la PKA (Chabot, 1993) alors que les canaux responsables du courant de type IK_{dr} sont phosphorylables par cette protéine kinase (Yazawa et al., 1990). Les canaux K^+ du RS sont également insensible à la lémakalim (100 μ M) et au glyburide (10 μ M), des drogues qui agissent spécifiquement au niveau des canaux K^+_{ATP} à titre d'ouvreur et de bloqueur

potassique respectivement. Par ailleurs, ils ne sont pas modulés par le GMPc (Chabot, 1993).

L'ensemble de ces résultats indiquent que les canaux K^+ du RS humain et ovin sont électrophysiologiquement et pharmacologiquement différents des canaux K^+ de la membrane sarcolemmale (IK_{to} , BK_{Ca} , IK_{dr} , IK_r , IK_s , IK_{ATP} et IK_1). Il n'existe aucun lien apparent entre ces canaux sélectifs aux ions monovalents du RS et ceux de la membrane de surface, si ce n'est du fait qu'ils peuvent être partiellement bloqués par des ions comme le TEA^+ et le Ba^{2+} (Coronado et al., 1979,82 ; Miller et al., 1979 ; Miller, 1982).

Par ailleurs il est intéressant de constater que les canaux Cl^- (Decrouy et al., 1996 ; Picher et al., 1997) et Ca^{2+} (Rousseau et al., 1986) de la membrane du RS sont respectivement différents des canaux Cl^- (Berryman et al., 2000) et Ca^{2+} de type L et T de la membrane de surface. Il apparaît donc que les canaux ioniques des membranes intracellulaires sont différents de ceux des membranes de surface, justifiant donc la mise en place de stratégies spécifiques et complémentaires pour révéler leur identité moléculaire.

En résumé, les canaux sélectifs aux cations monovalents dérivés du RS de cellules atriales humaines et ovines présentent un comportement électrophysiologique et un profil pharmacologique différents lorsqu'on les compare au canaux K^+ des membranes de surface. Ces canaux K^+ du RS possèdent une large conductance avec la présence d'un état sous-conducteur et ils ont une cinétique relativement lente. Ces canaux sont largement responsables de la conductance membranaire au cation monovalent K^+ (les ions K^+ étant les plus abondants dans le cytoplasme avec une concentration de 140 mM comparativement à 20 mM pour les ions Na^+). Ces canaux sont très importants afin de

maintenir le potentiel membranaire du RS éloigné de E_{Ca} en tout temps de façon à ce que les mouvements de Ca^{2+} aux bornes de la membrane du RS et donc le couplage excitation-contraction/relaxation soient efficaces. La sensibilité des canaux K^+ du RS au Ca^{2+} soit cytosolique (*cis*) ou luminal (*trans*) a été évaluée depuis de nombreuses années et n'a pas montré que ces canaux étaient sensibles au Ca^{2+} mais le fait d'avoir le rôle de maintenir le potentiel de membrane du RS éloigné de E_{Ca} ne veut pas dire qu'il ne pourrait pas être sensible aux variations de Ca^{2+} cytosolique. Ce canal fait probablement partie d'une nouvelle famille de canaux présent dans les membranes intracellulaires et dont l'identité moléculaire n'est pas encore connue.

Conclusion

Nous avons d'abord démontré qu'il était possible d'enrichir les fractions microsomales atriales humaines et ovines en RyRs. Ces fractions sont par le fait même enrichies en RS lourd. Ce travail est complémentaire à l'étude effectuée sur des préparations de RS auriculaire humain dans laquelle Karel Côté avait démontré la présence et la fonctionnalité du RS au niveau auriculaire et que les canaux Ca^{2+} de type « Ca^{2+} -release channel » présents au niveau du RS correspondaient à l'isoforme RyR_2 (Côté et al., 2000).

Les canaux sélectifs aux ions monovalents K^+ du RS présente une grande conductance, un état sous-conducteur à 50 % de l'amplitude du courant maximal ainsi qu'une cinétique lente. Les propriétés électrophysiologiques et biophysiques de ces canaux ainsi que leur insensibilité à de nombreux agents pharmacologiques suggèrent qu'ils sont différents des canaux K^+ de la membrane de surface. Cette différence des canaux K^+ du RS avec ceux de la membrane sarcolemmale nous indique donc que les canaux K^+ du RS font partie d'une famille de canaux cationiques faiblement sélectifs encore mal connue à ce jour.

Le rôle physiologique de ces canaux sélectifs aux ions monovalents (K^+) du RS est d'assurer le maintien du potentiel membranaire du RS à une valeur éloignée du potentiel d'équilibre du Ca^{2+} (E_{Ca}) lors de la libération rapide du Ca^{2+} . Ces canaux K^+ servent de contre-transporteurs de charges de façon à maintenir l'électroneutralité du système membranaire du RS d'où leur importance dans le réglage fin des flux de Ca^{2+} du RS afin d'avoir un couplage excitation-contraction/relaxation efficace.

Perspectives

Nous avons testés sur le canal K^+ du RS une batterie de substances pharmacologiques connus pour interagir avec les canaux K^+ de la membrane de surface. Nous n'avons pas trouvé d'effet de ces substances pharmacologiques sur notre canal, cependant il existe beaucoup d'autres agents pharmacologiques qui n'ont jamais été testés. Une approche intéressante serait de tester d'autres toxines comme par exemple, la dendrotoxine, qui à priori a une haute affinité pour le complexe protéique avec lequel elle interagit. Ceci pourrait permettre de purifier le canal K^+ du RS à homogénéité. C'est d'ailleurs de cette façon qu'on a réussi à purifier les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} de type BK_{Ca} en utilisant la ChTX et l'IbTX comme marqueur spécifique.

Les canaux K^+ du RS n'ont jamais été clonés. Une avenue intéressante serait sans aucun doute de réaliser sa purification. La purification devrait d'abord être effectuée sur du tissu animal comme de l'ovin par exemple puisqu'il est relativement facile d'obtenir de grandes quantités de ce tissu, contrairement au tissu humain. Il serait possible de solubiliser et de purifier le canal K^+ du RS sur colonne anionique suivi de triage des protéines sur tamis moléculaire et reconstitution des différents pics. Cependant, la reconstitution dans des BLPs de canaux ou de protéines préalablement solubilisés dans du CHAPS (détergent utilisé pour la solubilisation) est extrêmement difficile. Les détergents sont bien connus pour entraîner la rupture des membranes artificielles.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Dr. Éric Rousseau de m'avoir gentiment accueilli dans son laboratoire. L'expertise du Bilarium ainsi que ses nombreuses connaissances très élargies ont largement contribué à ma formation ainsi qu'à mon enrichissement personnel.

Je tiens également à remercier le Dr. Javier Teijeira et le Dr. David Greentree, les chirurgiens cardiovasculaires qui ont bien voulu participer à mon projet de maîtrise en me fournissant les appendices auriculaires humaines réséquées au cours des opérations cardiaques.

Je remercie tous les membres de l'équipe du Bilarium : Karel Côté, celui qui m'a initié aux techniques utilisées pendant ma maîtrise afin de poursuivre le projet supporté par la Fondation des Maladies du Cœur du Québec, Guy Page et Martin Cloutier, mes deux partenaires de cours gradués avec qui j'ai eu énormément de plaisir autant au niveau scientifique que dans ma vie personnelle. Finalement, un merci spécial à Sonia Proteau pour ses nombreux et judicieux conseils, sans qui, le laboratoire serait beaucoup moins fonctionnel.

Un gros merci aussi à la Faculté de Médecine et à la Fondation des Maladies du Cœur du Québec (FMCQ) pour avoir supporté financièrement ce projet.

Finalement, je tiens à remercier ma femme, Mélanie Dalpé, qui a acceptée de venir faire sa vie à Sherbrooke afin de me permettre de continuer mes études. Sans elle, la vie m'aurait semblée très pénible.

Bibliographie

Anderson K, Lay F A, Liu Q Y, Rousseau E, Erickson H P et Meissner G. Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex. *Journal of Biological Chemistry* 1989; **264**: 1329-1335.

Anzai K, Takano C, Tanaka K et Kirino Y. Asymmetrical lipid charge changes the subconducting state of the potassium channel from sarcoplasmic reticulum. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1994; **199**: 1081-1087.

Barry D M et Nerbonne J M. Myocardial potassium channels : Electrophysiological and molecular diversity. *Annual Reviews of Physiology* 1996; **58**: 363-394.

Bauman J L. Class III antiarrhythmic agents: the next wave. *Pharmacotherapy* 1997; **17(2)**: 76S-83S.

Bean B P, Rios E. Nonlinear charge movement in mammalian cardiac ventricular cells. Components from Na and Ca channel gating. *Journal of General Physiology* 1989; **94**: 65-93.

Benoît C, Renaudon B, Salvail D et Rousseau E. EETs relax airway smooth muscle via an EpDHF effect : BK_{Ca} channel activation and hyperpolarization. *American Journal of Physiology – Lung Cellular & Molecular Physiology* 2001; **280**: L965-L973.

Bernèche S et Roux B. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* 2001; **414**: 73-76.

Berryman M et Bretscher A. Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placenta microvilli. *Molecular Biology of the Cell* 2000; **11**: 1509-1521.

Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; **415**: 198-205.

Bertran G C, Biagetti M O, Valverde E R, Quinteiro R A. Effects of amiodarone and desethylamiodarone on the inward rectifying potassium current (I_{K1}) in rabbit ventricular myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1997; **31**: 914-920.

Bossen E H, Sommer J R et Waugh R A. Comparative stereology of mouse atria. *Tissue & Cell* 1981; **13**: 71-77.

Boyett M R. Current concepts on the electrophysiology of the myocardium. *Journal of Perinatal Medicine* 1986; **14(6)**: 349-354.

Bowma W C et Savage A O. Pharmacological actions of aminopyridines and related compounds. *Reviews in pure & applied pharmacological sciences* 1981; **2**: 317-371.

Butler A, Tsunoda S, McCobb D P, Wei A et Salkoff L. mSlo, a complex mouse gene encoding « maxi » calcium-activated potassium channels. *Science* 1993; **261(5118)**: 221-224.

Campbell K P et MacLennan D H. Purification and characterization of the 53,000-dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1981; **256(9)**: 4626-4632.

Caswell A H, Brandt N R, Brunsch-wig J P et Purkerson S. Localization and partial characterization of the oligomeric-disulfide-linked molecular weight 95 000 protein (triadin) which bind the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* 1991; **30**: 7507-7513.

Chabot H. Étude des canaux potassiques du reticulum sarcoplasmique des cellules ventriculaires de chien et des muscles squelettiques de lapin. (Mémoire de Maîtrise de l'Université de Sherbrooke) 1993 ; pp. 112.

Cheng H, Lederer M R, Xiao R P, Gomez A M, Zhou Y Y, Spurgeon H, Lakatta E G et Lederer W J. Excitation-contraction coupling in heart: new insights from Ca^{2+} sparks. *Cell Calcium* 1996; **20(2)**: 129-140.

Chini E N, de Faria F O, Cardoso C M et de Meis L. The enhancement of Ca^{2+} efflux from sarcoplasmic reticulum vesicles by urea. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 1992; **299(1)**: 73-76.

Colquhoun D et Sigworth F. Fitting and statistical analysis of single channel records. In: Single-Channel Recording. (B. Sakmann et E. Neher, éd.) *Plenum Press, New York* 1983; 191-264.

Coraboeuf E et Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Archives* 1982; **392**: 352-359.

Cornea R L, Jones L R, Autry J M et Thomas D D. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry* 1997; **316**: 19-23.

Corompt E, Bessard G, Lantuejoul S, Naline E, Advenier C et Devillier P. Inhibitory effects of large Ca^{2+} -activated K^+ channel blockers on beta-adrenergic- and NO-donor-mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1998; **357(1)**: 77-86.

Coronado R et Miller C. Voltage-dependent caesium blockade of cation channel from fragmented sarcoplasmic reticulum. *Nature (London)* 1979; **280**: 495-497.

Coronado R et Miller C. Decamethonium and hexamethonium block K^+ channels of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1980a; **288**: 495-497.

Coronado R et Miller C. Conduction and block by organic cations in a K^+ selective channel from sarcoplasmic reticulum incorporated into planar phospholipid bilayers. *Journal of General Physiology* 1982; **79**: 529-547.

Coronado R, Rosenberg R L et Miller C. Ionic selectivity, saturation, and block in a K^+ -selective channel from sarcoplasmic reticulum. *Journal of General Physiology* 1980b; **76**: 425-446.

Côté K, Proteau S, Teijeira J et Rousseau É. Characterization of the sarcoplasmic reticulum K^+ and Ca^{2+} - release channel – ryanodine receptor – in human atrial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000; **32**: 2051-2063.

Davis B A, Edes I, Gupta R C, Young E F, Kim H W, Steenaart N A, Szymanska G et Kranias E G. The role of phospholamban in the regulation of calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1990; **99(2)**: 83-88.

Decrouy A, Juteau M et Rousseau E. Examination of the role of phosphorylation and phospholamban in the regulation of the cardiac sarcoplasmic Cl^- channel. *Journal of Membrane Biology* 1995; **146**: 315-326.

Decrouy A, Juteau M, Proteau S, Teijeira J et Rousseau E. Biochemical regulation of sarcoplasmic reticulum Cl^- channel from human atrial myocytes: involvement of phospholamban. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1996; **28**: 767-780.

Dods M L, Kargacin M E et Kargacin G J. Effects of anti-oestrogens and beta-oestradiol on calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum. *British Journal of Pharmacology* 2001; **132(7)**: 1374-1382.

Doyle D A, Morais-Cabral J H, Pfuetzner R A, Kuo A, Gulbis J M, Cohen S L, Chait B T et MacKinnon R. The structure of the potassium channel : molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 1998; **280**: 69-76.

Edwards G et Weston A H. Pharmacology of the potassium channel openers. *Cardiovascular Drugs & Therapy* 1995; **9 Suppl 2**: 185-193.

Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological Reviews* 1977; **57**: 71-108.

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology* 1983; **245**: C1-C14.

Fabiato A. Appraisal of the physiological relevance of two hypothesis for the mechanism of calcium release from the mammalian cardiac sarcoplasmic reticulum: calcium-induced

release versus charge-coupled release. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1989; **89**: 135-140.

Franzini-Armstrong, C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB Journal* 1999; **13 Suppl 2**: S266-S270.

Franzini-Armstrong C, Protasi F et Ramesh V. Comparative ultrastructure of Ca²⁺ release units in skeletal and cardiac muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; **853**: 20-30.

Franzini-Armstrong, C et Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Reviews* 1997; **77**: 699-729.

Gyorke I et Gyorke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites. *Biophysical Journal* 1998; **75**: 2801-2810.

Hanck D A, Sheets M F et Fozzard H A. Gating currents associated with Na channels in canine cardiac Purkinje cells. *Journal of General Physiology* 1990; **95**: 439-457.

Hill J A, Jr., Coronado R et Strauss H C. Potassium channel of cardiac sarcoplasmic reticulum is a mult-ion channel. *Biophysical Journal* 1989; **55**: 35-45.

Hill J A, Jr., Coronado R et Strauss H C. Open-channel subconductance state of K⁺ channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology* 1990; **258**: H159-H164.

Hille B. Ionic channels of excitable membranes, second edition. Sinauer associates inc. 1992.

Hirashima N, Ishibashi H et Kirino Y. Comparative electrophysiological study of reconstituted giant vesicle preparations of the rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum K^+ channel. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; **1067**: 235-240.

Jayaraman T, Brillantes A M, Timerman A P, Fleischer S, Erdjument-Bromage H, Tempst P et Marks AR. FK506 protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *Journal of Biological Chemistry* 1992; **267(14)**: 9474-9477.

Jones L R, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen A O et Kelley J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1995; **270**: 30787-30796.

Kadambi V J et Kranias E G. Phospholamban: a protein coming of age. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 1997; **239**: 1-5.

Kalman K, Nguyen A, Tseng-Crank J, Dukes I D, Chandy G, Hustad C M, Copeland N G, Jenkins N A, Mohrenweiser H, Brandriff B, Cahalan M, Gutman G A, et Chandy K G. Genomic organization, chromosomal localization, tissue distribution, and biophysical characterization of a novel mammalian Shaker-related voltage-gated potassium channel, Kv1.7. *Journal of Biological Chemistry* 1998; **273(10)**: 5851-5857.

Kargacin G J, Ali Z et Kargacin M E. Ruthenium red reduces the Ca^{2+} sensitivity of Ca^{2+} uptake into cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Archives – European Journal of Physiology* 1998; **436**: 338-342.

Kargacin M E, Ali Z, Ward C A, Pollock N S et Kargacin G J. Tamoxifen inhibits Ca^{2+} uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Archives-European Journal of Physiology* 2000; **440**: 573-579.

Kawano S, Kuruma A, Hirayama Y et Hiraoka M. Anion permeability and conduction of adenine nucleotide through a chloride channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**: 2085-2092.

Kaczorowski G J, Knaus H G, Leonard R J, McManus O B et Garcia M L. High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *Journal of bioenergetics & biomembranes* 1996; **28(3)**: 255-267.

Kenyon J L, Gibbons W R. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *Journal of General Physiology* 1979; **73**: 139-157.

Kiehn J, Thomas D, Karle C A, Schöls W et Kübler W. Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1999; **359**: 212-219.

Knudson C M, Stang K K, Jorgensen A O et Campbell K P. Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *Journal of Biological Chemistry* 1993a; **268**: 12637-12645.

Knudson C M, Stang K K, Moomaw C R, Slaughter C A et Campbell K P. Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *Journal of Biological Chemistry* 1993b; **268**: 12646-12654.

Kourie J I, Laver D R, Ahern G P et Dulhunty A F. A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 1996; **270**: t-86.

Kourie J I. pH-modulation of chloride channels from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Journal of Membrane Biology* 1999; **167**: 73-83.

Labarca P P et Miller C. A K^+ -selective, three-state channel from fragmented sarcoplasmic reticulum of frog leg muscle. *Journal of Membrane Biology* 1981; **61**: 31-38.

Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.

Latorre R et Miller C. Conduction and selectivity in potassium channels. *Journal of Membrane Biology* 1983; **71**: 11-30.

Leong P et MacLennan D H. Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins. *Biochemistry and Cell Biology* 1998; **76**: 681-694.

Liu Q Y, Lai F A, Shen W K, Meissner G et Strauss H C. Reconstitution of the solubilized cardiac sarcoplasmic reticulum potassium channel. Identification of a putative Mr approximately 80 kDa polypeptide constituent. *FEBS letters* 1991a; **291**: 13-16.

Liu Q Y, Rasmusson R L, Liu Q X et Strauss H C. Voltage-dependent open channel blockade of the cardiac sarcoplasmic reticulum potassium channel by 4-aminopyridine. *Canadian Journal of Cardiology* 1998; **14**: 275-280.

Liu Q Y et Strauss H C. Blockade of cardiac sarcoplasmic reticulum K^+ channel by Ca^{2+} : two-binding-site model of blockade. *Biophysical Journal* 1991b; **60**: 198-203

Lompre A M, Anger M et Levitsky D. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and expression. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1994; **26**: 1109-1121.

Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et Randall R J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; **193**: 265-275.

Lugnier C, Muller B, Le Bec A, Beaudry C, et Rousseau E. Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 1993; **265**: 1142-1151.

Ma J. Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium channel of skeletal muscle. *Journal of General Physiology* 1993; **102**: 1031-1056.

Martin R L, Koumis S et Ten Eick R E. Comparison of the effects of internal $[Mg^{2+}]$ on IK_1 in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1995; **27(1)**: 673-691.

Martonosi A N. Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiological Reviews* 1984; **64**: 1240-1320.

McKinley D et Meissner G. Evidence for a K^+ , Na^+ permeable channel in sarcoplasmic reticulum. *Journal of Membrane Biology* 1978; **44**: 159-186.

Meissner G. Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochimica and Biophysica Acta* 1975; **389**: 51-68.

Meissner G. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} -release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annual Review of Physiology* 1994; **56**: 485-508.

Meissner G et Henderson J S. Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 1987; **262**: 3065-3073.

Meissner G, Rousseau E, Anthony Lai F, Liu Qi-Yi et Anderson K A. Biochemical characterization of the Ca^{2+} release channel of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1988; **82**: 59-65.

Miller C. Bis-quaternary ammonium blockers as structural probes of the sarcoplasmic reticulum K^{+} channel. *Journal of General Physiology* 1982; **79**: 869-891.

Miller C. Voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum: steady-state electrical properties. *Journal of Membrane Biology* 1978; **40**: 1-23.

Miller C. Integral membrane channels: studies in model membranes. *Physiological Reviews* 1983; **63**: 1209-1243.

Miller C. See potassium run. *Nature* 2001; **414**: 23-24.

Miller C, Bell J E et Garcia A M. The potassium channel of sarcoplasmic reticulum. *Current topics in Membrane Transports* 1984; **21**: 99-132.

Miller C et Rosenberg R L. A voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum. Effects of transition metal ions. *Biochemistry* 1979; **18**: 1138-1145.

Morais-Cabral J H, Zhou Y et MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 2001; **414**: 37-42.

Noma A et Shibasaki T. Membrane current through adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology* 1985; **363**: 463-480.

Opie L H. The heart; Physiology, from cell to circulation. 3rd, New-York: 1998

Picher M, Decrouy A, Proteau S et Rousseau E. Conducting and voltage-depedent behaviors of the native and purified SR Ca²⁺-release channels from the canine diaphragm. *Biochimia and Biophysica Acta* 1997; **1328**: 243-260.

Picher M, Decrouy A et Rousseau E. Conducting and voltage-depedent behaviors of potassium channels reconstituted from diaphragm sarcoplasmic reticulum: comparison with the cardiac isoform. *Biochimia and Biophysica Acta* 1996; **1279**: 93-103.

Piras L, Frau G, Terrosu P, Sannia L, Dore L, Carta G et Ibba G V. Treatment of atrial arrythmias with amiodarone. Short-term and long-term results. *Bollettino della Societa Italiana di Cardiologia* 1981; **26(6)**: 545-552.

Rice J J et Jafri M S. Modelling calcium handling in cardiac cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 2001; **359**: 1143-1157.

Rousseau E. Single chloride-selective channel from cardiac sarcoplasmic reticulum studied in planar lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology* 1989; **110**: 39-47.

Rousseau E et Chabot H. Identification fonctionnelle du canal calcique du réticulum sarcoplasmique. *Médecine Science* 1992 ; **8** : 950-957.

Rousseau E, Chabot H et Beaudry C et Muller B. Reconstitution and regulation of cation-selective channels from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1992; **114**: 109-117.

Rousseau E, Pinkos J et Savaria D. Functional sensitivity of the native skeletal Ca^{2+} -release channel to divalent cations and the Mg-ATP complex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1992; **70**: 394-402.

Rousseau E, Smith J S, Henderson J S et Meissner G. Single channel and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophysical Journal* 1986; **50**: 1009-1014.

Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, Pak M D et Wei A. An essential 'set' of K^{+} channels conserved in flies, mice and humans. *Trends in Neurosciences* 1992; **15(5)**: 161-166.

Salvail D, Dumoulin M et Rousseau E. Direct modulation of tracheal Cl^{-} -channel activity by 5,6- and 11,12-EET. *American Journal of Physiology* 1998; **275**: L432-L441.

Scott B T, Simmerman H K, Collins J H, Nadal-Ginard B et Jones L R. Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* 1988; **263**: 8958-8964.

Sanguinetti M C et Jurkiewicz N K. Two components of cardiac delayed rectifier Potassium sup + current: differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *Journal of General Physiology* 1990; **96**: 195-215.

Sanguinetti M C et Jurkiewicz N K. Delayed rectifier outward Potassium sup + current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *American Journal of Physiology* 1991; **260**: H393-H399.

Shen W K, Rasmusson R L, Liu Q Y et Crews A L et Strauss H C. Voltage and temperature dependence of single K⁺ channels isolated from canine cardiac sarcoplasmic. *Biophysical Journal* 1993; **65**: 747-754.

Shieh C-C, Coghlan M, Sullivan J P et Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews* 2000; **52**: 557-593.

Sommer J R et Waugh R A. The ultrastructure of the mammalian cardiac muscle cell—with special emphasis on the tubular membrane systems. A review. *American Journal of Pathology* 1976; **82**: 192-232.

Sommer J R et Johnson E A. Handbook of Physiology. In: Berne R M, ed. *American Physiological Society Section*, 2nd ed. Bethesda Maryland 1979: 113-186.

Sperelakis N. Cell physiology source book, second edition. Academic Press: 1997.

Sutko J L et Airey J A. Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels : does diversity in form equal diversity in function ?. *Physiological Reviews* 1996; **76(4)**: 1027-1071.

Sutko J L., Airey J A., Welch W et Ruest L. The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacological Reviews* 1997; **49**: 53-98.

Snyders D J. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research* 1999; **42**: 377-390.

Stein P G, Nelson T E et Palade P T. Mammalian sarcoplasmic reticulum K channel recorded in skinned fibers. *Biophysical Journal* 1989; **55**: 480a. (Abstract).

Tanifuji M, Sokabe M et Kasai M. An anion channel of sarcoplasmic reticulum incorporated into planar lipid bilayers : single-channel behavior and conductance properties. *Journal of Membrane Biology* 1987; **99**: 103-111.

Tomlins B et Williams A J. Solubilisation and reconstitution of the rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum K⁺ channel into liposomes suitable for patch clamp studies. *Pfluegers Archives* 1986; **407**: 341-347.

Tomlins B, Williams A J et Montgomery R A P. The characterization of a monovalent cation-selective channel of mammalian cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Membrane Biology* 1984; **80**: 191-199.

Tortora G J et Grabowski S R. Principes d'anatomie et de physiologie. Collégial et Universitaire, Anjou: 1994.

Tristani-Firouzi M, Chen J, Mitcheson J S et Sanguinetti M C. Molecular biology of K⁺ channels and their role in cardiac arrhythmias. *The American Journal of Medicine* 2001; **110(1)**: 50-59.

Valente A P, Barrabin H, Jorge R V, Paes M C et Scofano H M. Isolation and characterization of the Mg^{2+} -ATPase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membrane preparations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; **1039(3)**: 297-304.

Veldkamp M W, van Ginneken A C et Bouman L N. Single delayed rectifier channels in the membrane of rabbit ventricular myocytes. *Circulation Research* 1993; **72(4)**: 865-878.

Vogalis F et Goyal R K. Activation of small conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. *Journal of Physiology* 1997; **502 (Pt 3)**: 497-508.

Wagenknecht T et Radermacher M. Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Current Opinions in Structural Biology* 1997; **7(2)**: 258-265.

Wickman K D, Iniguez-Lluhl J A, Davenport P A. Recombinant G-Protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* 1994; **368**: 255-257.

Wier G. Cytoplasmic Ca^{2+} in mammalian ventricle: dynamic control by cellular processes. *Annual Review of Physiology* 1990; **52**: 467-485

Wolosker H, Pacheco A G et de Meis L. Local anesthetics induce fast Ca^{2+} efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 1992; **267(9)**: 5785-5789.

Xu L, Mann G et Meissner G. Regulation of the cardiac Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} , H^{+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotide under normal and stimulated ischemic conditions. *Circulation Research* 1996; **79**: 1100-1109.

Yano K et Zarain-Herzberg A. Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Molecular & Cellular Biochemistry* 1994; **135**: 61-70.

Yazawa K et Kameyama M. Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Physiology* 1990; **421**: 135-150.

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi Y M et Jones L R. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 23389-23397.

Zhou Y, Morais-Cabral J H et Kaufman A et MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel – Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 2001; **414**: 47-48.